Studien über Glykogen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

an der

Ruprecht-Carls-Universität

der

Hohen medicinischen Facultät zu Heidelberg

vorgelegt von

Wilhelm Saake
aus Wolfenbüttel.

Separatabdruck aus der Zeitschrift für Biologie.

München 1893.
Druck von R. Oldenbourg.

Studien über Glykogen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

an der

Ruprecht-Carls-Universität

der

Hohen medicinischen Facultät zu Heidelberg

vorgelegt von

Wilhelm Saake
aus Wolfenbüttel.

Separatabdruck aus der Zeitschrift für Biologie.

München 1893.
Druck von R. Oldenbourg.

Dekan: Prof. Dr Vierordt.

Referent: Geh. Rath Prof. Dr. W. Kühne.

Studien über Glykogen.

Von

W. Saake,

approb. Arzt aus Wolfenbüttel.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

Seit der Entdeckung des Glykogens durch Cl. Bernard und Hensen haben die Ansichten über Provenienz und Zweck dieses Kohlenhydrates im Körper vielfache Wandlungen durchgemacht, und noch heutigen Tages sind die Meinungen darüber zum Theil so abweichend von einander, dass sie sich ausschliessen müssen. Darin aber stimmten bislang alle Forscher überein, dass sie das Glykogen stillschweigend als präformirt in den Geweben annahmen, aus denen es durch die verschiedenen Methoden darstellbar ist.

Nur sehr vereinzelt begegnet man anderen Ansichten, welche, die eine deutlicher, die andere mehr schüchtern, die Abspaltung des Kohlenhydratmoleküls aus einer Proteïdsubstanz bei der Darstellung des ersteren lehren, wie z. B. Landwehr[1]), Krukenberg[2]), Hammersten[3]) und Andere, auf deren diesbezügliche Arbeiten ich später zurückkommen werde.

Einen entschiedeneren Standpunkt in dieser Frage nimmt neuerdings Fränkel[4]) ein, welcher in seiner gleich der vorliegenden betitelten Arbeit die Meinung offen und klar ausspricht, das Glykogen komme im Körper gar nicht als solches präformirt, sondern als Eiweissverbindung vor und werde aus der letzteren erst durch die gebräuchlichen Darstellungsmethoden abgespalten.

1) Landwehr, Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 5.
2) Krukenberg, Zeitschr. f. Biol. Bd. 20.
3) Hammersten, Pflüger's Arch. Bd. 36 S. 373.
4) Fränkel, Pflüger's Arch. Bd. 52.

Zwar findet sich schon in einer Arbeit Langleys [1]) eine Stelle, aus der man eine ähnliche Ansicht herausinterpretiren kann. Derselbe sagt, die hyaline Substanz des Paraplasmas der Leberzellen bestehe aus Eiweiss und Glykogen (this substance consists partly of glycogen and in part probably of a proteid). Doch ersieht man nicht, ob er diese Substanz als eine chemische Verbindung oder bloss als eine Vermischung, etwa eine Imbibition des Eiweisses mit Glykogen aufgefasst wissen will.

Der Ansicht Fränkel's können sowohl die Anhänger der Ersparniss- wie der Anhydridhypothese sympathisch gegenüberstehen. Erstere werden die Möglichkeit, dass das Glykogen mit einem Atomencomplexe des Eiweisses verbunden bleibe resp. wieder zusammentrete, um so weniger negiren, als sie das Glykogen aus dem Eiweiss sich abspalten lassen, also eine gewisse Affinität der beiden Körper präsumiren. Andererseits werden auch diejenigen, welche noch heute die Anhydridhypothese verfechten, in der Ansicht Fränkel's keinen Widerspruch ihres Theorems finden. Liesse sich doch die Erscheinung, dass beim Diabetes die Stickstoffausscheidung dem Zuckergehalte des Harnes ziemlich proportional verläuft, durch die Annahme einer Glykogeneiweissverbindung auch vom Standpunkte der Anhydridhypothese leicht erklären.

Ferner wäre, Fränkel's Behauptung als richtig vorausgesetzt, das reichliche Vorkommen von Glykogen bei pneumonischer Hepatisation der Lunge, wie es von Kühne [2]) und von Sotnischewsky [3]) zuerst gefunden wurde, leicht begreiflich. Es würde das Glykogen hier als Spaltungsprodukt neben Fibrin abgelagert aufzufassen sein.

Dennoch ist die Behauptung Fränkel's fast allen bisherigen Annahmen so entgegengesetzt und so tief einschneidend in die Lehre vom Kohlenhydratstoffwechsel, dass eine Controle der angeführten Versuche und weitere Forschungen über die angeregte Frage unbedingt nothwendig erscheinen.

---

1) Langley, Preliminary account of the structure etc., Proceedings of the royal society of London 1883, Bd. 34.

2) W. Kühne, Virchow's Arch. Bd. 32.

3) Sotnischewsky, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 8.

Ich habe es mir deswegen in der folgenden Arbeit zur Aufgabe gemacht, die Angaben Fränkel's einer nochmaligen Controle zu unterziehen.

Fränkel argumentirt, um es kurz zu fassen, etwa folgendermaassen: Lebergewebe (Fränkel scheint nur dieses in's Auge gefasst zu haben) gibt weder frisch mit kaltem Wasser zerrieben, noch nach Coagulation der zerkleinerten Leber mit Alkohol und darauf erfolgendem Auslaugen des so erhaltenen getrockneten Leberpulvers mit kaltem Wasser, Glykogen an das Filtrat. Sobald man aber das frische oder zuvor in Alkohol getrocknete Lebergewebe mit Säuren, Lösungen der Salze schwerer Metalle oder mit kochendem Wasser behandelt, gehen beträchtliche Glykogenmengen in Lösung. Alle diese Mittel aber sind eiweisscoagulirende Agentien. Deswegen liegt die Vermuthung nahe, dass eben jene Coagulation des Eiweisses es sei, welche durch Trennung der hypothetischen Glykogeneiweissverbindung das Glykogen als solches frei werden lasse.

Eine andere Möglichkeit, den Umstand, dass kein Glykogen an kaltes Wasser abgegeben wird, zu erklären, wird zwar von Fränkel auch hervorgehoben, aber meines Erachtens zu wenig gewürdigt. Er sagt, es sei möglich, dass das Glykogen deshalb verhindert werde, in Lösung zu gehen, weil es durch die Wirkung des Alkohols mit gefälltem Eiweiss umschlossen werde und es durch die Untersuchung von Bock und Hoffmann[1]) sowie Langley[2]) bekannt sei, dass das Glykogen als amorphe, schollenähnliche Masse im Innern der Zellen liege.

Ohne aber diese Möglichkeit einer weiteren Discussion zu unterziehen, folgert Fränkel aus dem oben angeführten Verhalten der Eiweiss coagulirenden Agentien auf die Existenz eines Glykogeneiweisses.

Dass durch die Folgerung auf der einen Seite die mechanische Schwierigkeit, welche durch die Structur der glykogenführenden Zellen der Lösung des sogut wie nicht dialysirenden Glykogens entgegengesetzt wird, bei weitem zu gering angeschlagen ist, andererseits die Deduction Fränkel's nicht hinreichend begründet wird, liegt auf der Hand.

---

1) Bock und Hoffmann, Ueber das mikrochemische Verhalten der Leberzellen. Virchow's Arch. Bd. 56.

2) Langley, a. a. O.

Wenn eine Leber, die vorher an kaltes Wasser kein Glykogen abgab, solches sofort nach Zusatz von Trichloressigsäure in's Filtrat gehen lässt, so ist diese Erscheinung noch lange kein Grund für die Annahme der Fränkel'schen Ansicht. Könnte nicht, abgesehen davon, dass die Behauptung, die Leber gebe kein Glykogen an kaltes Wasser, wie ich zeigen werde, durchaus nicht zutrifft, die Erscheinung, dass die Lösung des Glykogens nach Trichloressigsäurezusatz weit leichter vor sich geht, einfach darauf beruhen, dass das Plasma, welches das Glykogen als schlüpfrige Hülle umzieht und wie die Membran eines Dialysators wirken muss, durch die energische Coagulation mit Trichloressigsäure plötzlich schrumpft? Durch die Schrumpfung aber muss nothwendig ein Zerreissen der Eiweissmembran erfolgen, da auf den incompressibelen, ja sogar durch Attraction von Lösungswasser noch quellenden Inhalt ein concentrisch gerichteter Druck ausgeübt wird. Aus den so entstandenen Rissen und Lücken wird das Glykogen um so leichter austreten können, als es durch die Zusammenziehung der coagulirten Eiweisskörper gewissermaassen aus seinen zuvor eingenommenen Hohlräumen ausgepresst wird.

Diese Erklärung der im Allgemeinen richtigen Beobachtung Fränkel's erschien mir von vorneherein viel näher liegend als die von dem genannten Forscher gegebene.

Dass die Trichloressigsäure in der That bei der Coagulation der Eiweisskörper zugleich ein bedeutendes Schrumpfen bewirkt, lässt sich leicht an einer Fibrinflocke oder noch besser an einem zuvor durch $^1/_2$ %ige Chlorkaliumlösung selbst für maximale Reize unempfindlich gemachten Muskel am Myographiondemonstriren. Beide verkürzen sich beim Eintauchen in Trichloressigsäure erheblich.[1])

Wesentlich anders liegen die Verhältnisse, wenn die Leber in Alkohol coagulirt und dann zu einem feinen Pulver zerrieben und getrocknet wird. Freilich wird auch der Alkohol durch seine coagulirende Wirkung die Eiweisshülle schrumpfen machen. Allein da gleichzeitig auch das Glykogen schrumpft und gefällt wird, so kann

1) Ein Sartorius von Rana temporaria verkürzte sich in 5%iger Trichloressigsäure bis auf $^2/_3$ seiner ursprünglichen Länge. Alkohol bewirkte bei dem gleichen Muskel der anderen Seite eine Verkürzung auf etwa $^9/_{10}$ der ursprünglichen Länge. Die Belastung betrug in beiden Fällen 10 g.

Eine Fibrinflocke verkürzte sich von 11 auf 8 mm.

von einer Spannung, welche die schrumpfende Eiweisshülle auf ihren Inhalt ausübt, hier nicht die Rede sein. Es fehlt somit auch die Veranlassung, welche die Sprengung der Umschliessung verursachen könnte. Wird ein auf die beschriebene Weise dargestelltes Pulver getrocknet, so wandelt sich das coagulirte Eiweiss zu einer hornartig festen Masse um, die sich fest um das eingeschlossene Glykogen herumlagert Zerreibt man ein solches Pulver in Wasser, um das Glykogen zu extrahiren, so quillt, wie jedes durch Alkohol coagulirte Eiweiss, die äussere Hülle stark auf und wirkt wiederum wie eine continuirliche Dialysatormembran, die kein Glykogen durchtreten lässt.

In ähnlicher Weise wird man sich die Schwierigkeit der Lösung des Glykogens bei dem künstlich dargestellten Glykogeneiweissgemisch zu erklären haben. Durch die Behandlung des Gemisches mit Alkohol schrumpft das Glykogen und gleichzeitig wird es von coagulirtem Eiweiss umschlossen.

Wie sehr man bei der Erwägung dieser Frage auf die von Fränkel ganz ausser Acht gelassenen Diffusionsverhältnisse des Glykogens Rücksicht zu nehmen hat, erhellt daraus, dass man Schnitte von Lebern oder fötalen Geweben, die gut mit Celloïdin durchtränkt sind, im Wasser aufbewahren kann, ohne befürchten zu müssen, dass das Glykogen aufgelöst werde. Ich habe Schnitte einer gut in Celloïdin eingebetteten Froschleber zwei Tage in einem Thermostaten bei 40° C. in Wasser aufbewahrt und nach Ablauf dieser Frist intensive Jodfärbung aller glykogenhaltigen Stellen erzielen können. Die Jodreaction blieb aus, sobald ich dem Wasser filtrirten Speichel zusetzte und die Schnitte damit einige Zeit bei Blutemperatur auslaugte.

Während also das Glykogen als solches nicht durch den Celloïdinmantel zu diffundiren vermochte, gelang es der gebildeten Maltose leicht, denselben zu durchdringen, denn das Wasser, welches sehr viele solcher Schnitte enthielt, reducirte frische Fehling'sche Lösung sehr deutlich.

Da Fränkel bei der Verfolgung seines Problems fast lediglich Versuche anführt, welche die Existenz eines Glykogeneiweisses wahrscheinlich machen sollen, dagegen die von mir in obigen, zur allgemeinen Orientirung voraufgeschickten Bemerkungen betonte Seite

der Frage in wenigen Sätzen abfertigt, so habe ich neben einer Wiederholung der Fränkel'schen Versuche bei meinen Arbeiten besonders darauf mein Augenmerk gerichtet, ob in der That die Verhältnisse bei den glykogenhaltigen Geweben so liegen, dass meine theoretischen Erörterungen eine genügende Stütze daran finden.

Zuerst habe ich deshalb viele Gewebe, die normalerweise Glykogen oder, wie Fränkel will, eine Glykogenverbindung enthalten, einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Grösstentheils konnte ich dabei ältere Beobachtungen bestätigen, zum Theil aber kam ich zu Resultaten, die von den bisher veröffentlichten etwas abweichen, weswegen die Untersuchungen im Folgenden mitgetheilt sein mögen.

I. Die Leber des erwachsenen Organismus.

Histochemische Arbeiten über Leberglykogen sind von Cl. Bernard[1]), Schiff[2]), Bock & Hoffmann[3]), O. Nasse[4]), E. Külz[5]), Langley[6]), Kayser[7]), Afanassiew[8]) und Barfurth[9]) geliefert worden.

Leider würde es zu weit führen und den mir zu Gebote stehenden Raum überschreiten, wollte ich auf die zum Theil recht interessanten Arbeiten der genannten Forscher eingehen. Ich muss mich deshalb mit deren namentlicher Aufführung begnügen, um sofort meine eigenen Beobachtungen folgen zu lassen.

Dieselben sind zumeist an der Leber vom Schaf, weniger an der Hunde-, Kaninchen- und Froschleber gewonnen. Ich untersuchte

1) Cl. Bernard, Compt. rend. T. 75.

2) Schiff, Untersuchungen über die Zuckerbildung in der Leber. Würzburg 1859.

3) Bock u. Hoffmann, a. a. O.

4) O. Nasse, Arch. des Vereins f. gemeinschaftl. Arbeiten. Bd. 4.

5) E. Külz, Kommt Glykogen in der ersten Anlage des Hühnchens vor? Pflüger's Arch. Bd. 24 S. 64.

6) Langley, a. a. O.

7) Kayser, Ueber mikroskopische Veränderungen der Leberzellen während der Verdauung. Breslauer ärztl. Zeitschr. 1879 No. 19.

8) Afanassiew, Ueber anatomische Veränderungen der Leber während verschiedener Thätigkeitszustände. Pflüger's Arch. Bd. 30.

9) Barfurth, Vergleichend-histochemische Untersuchungen über das Glykogen. Arch. f. mikrosk. Anatomie, Bd. 25, 1885.

das Material sowohl in frischem Zustande in 0,6%iger Kochsalzlösung, wie auch nach Härtung in Chromaten, Sublimat, Osmiumsäure, Trichloressigsäure und Alkohol.

1. Untersuchung der frischen Leber.

Wenn man mit einem Messer von der Schnittfläche einer Leber eine geringe Menge Gewebe abschabt und auf dem Objektträger in Chlornatriumlösung untersucht, so wird man in den einzelnen Leberzellen selbst dann, wenn sie reichlich Glykogen enthalten, eine fast über die ganze Zelle verbreitete feine Körnelung wahrnehmen können und dieselbe, je nachdem man auf den optischen Querschnitt oder auf die obere oder untere Fläche einstellt, am Rande dichter oder mehr gleichmässig verbreitet antreffen. Von glänzenden Schollen oder Kugeln wird man, falls man sich durch die etwa vorhandenen, leicht erkennbaren Fetttropfen nicht irre führen lässt, nichts bemerken. Ebenso ist es schwer, einen Kern in der Leberzelle zu entdecken. Erst auf Zusatz von Essigsäure kommt dieser zum Vorschein, während gleichzeitig die Leberzelle selbst schärfer begrenzt wird. Alkoholzusatz bewirkt das Gegentheil: die Zelle wird trüb, opak und lässt den Kern nicht erkennen. Von einer Volumensverminderung nach Alkoholzusatz konnte ich mich nie überzeugen. Lässt man jedoch statt Alkohol Trichloressigsäure auf die Zellen unter dem Deckgläschen einwirken, so sieht man, wie zuerst eine Umwandlung eintritt, als ob Essigsäure zugesetzt sei. Bald aber werden die Zellen wieder trüb und schrumpfen, wie man an geeigneten Stellen sehen kann, oft erheblich, um gleichzeitig am Rande wie angefressen oder zerfasert zu erscheinen. Zugleich fällt es auf, dass das ganze Gesichtsfeld sich mit molekularem Detritus, der Fetttropfen und sehr feine Granula enthält, angefüllt hat. Ob diese, durch weiteren Zusatz von Alkohol sich zu baumartig verzweigten Figuren, Streifen oder Flocken zusammenballende Masse aus den ausgefaserten Zellen stammt oder schon vorher in der Flüssigkeit enthalten war und durch die Coagulation vermittelst Trichloressigsäure nur deutlicher sichtbar wurde, vermochte ich bei dem raschen Fliessen der fraglichen Objekte nach Zusatz des diese Veränderung herbeiführenden Agens nicht mit Bestimmtheit zu entscheiden. Doch möchte ich

eher die erstere Vermuthung annehmen, weil die massenhaft im Detritus vorhandenen Fetttröpfchen doch auch vor Zusatz der Trichloressigsäure hätten bemerkt werden müssen.

Aehnlich verhalten sich die Leberzellen dem Sublimat gegenüber.

Versucht man an frischen Leberzellen, von denen man als sicher voraussetzen kann, dass sie glykogenhaltig sind, dadurch die Glykogenreaction hervorzurufen, dass man unter dem Deckgläschen sehr verdünnte Lugol'sche Lösung zufliessen lässt, so ist man sehr überrascht, die Leberzellen sich ebenso wie die übrigen gerade im Gesichtsfeld liegenden morphologischen Gewebselemente nur gelb und nicht braun färben zu sehen. Erst bei Zusatz stärkerer Lugol'scher Lösung tritt die braune Färbung hervor. Gleichzeitig nehmen aber auch andere Gebilde, z. B. Blutkörperchen, bei diesem Verfahren eine dunkelbraune Farbe an.

Verfährt man indessen bei der Glykogenreaction so, dass man zuerst eine die Coagulation bewirkende Flüssigkeit, am besten Trichloressigsäure, auf die Leberzellen einwirken lässt, und dann die schwache Jodjodkaliumlösung, so erhält man sofort eine distincte, charakteristische Glykogenreaction der Zellen und einzelner Zellfragmente.

Diese Erscheinung scheint sehr zu Gunsten der Fränkel'schen Ansicht zu sprechen, indem sie darauf hinzudeuten scheint, dass erst durch die Einwirkung der Trichloressigsäure das Glykogen abgespalten wird.

Erwägt man indessen, wie gering die Mengen Jod sind, welche bei dem beschriebenen Verfahren einer relativ beträchtlichen Menge Glykogen zugeführt werden, und bedenkt man, dass die lebensfrische Leberzelle, wie Plosz[1]) gezeigt hat, alkalisch, die starre dagegen sauer reagirt, dass also im ersterwähnten Falle ein Theil des Jods noch an Alkali gebunden wird, so verliert dieses Factum sein Ueberraschendes, zumal Jedem, der mit dem Nachweis von Glykogen einigermaassen vertraut ist, bekannt sein wird, dass man oft erhebliche Mengen Jod selbst zu einer sauer reagirenden Glykogen-

1) Plosz, Ueber die eiweissartigen Substanzen der Leberzelle. Pflüger's Arch. Bd. 7 S. 371.

lösung zusetzen kann, ohne die charakteristische Färbung dauernd zu erzielen.

Ueber die Anordnung resp. Ablagerung des Glykogens in der frischen Leberzelle konnte ich mich nie so sicher informiren, wie es zur Lösung der vorliegenden Frage wohl wünschenswerth wäre. Ohne Jodfärbung vermag man an Ausstrichpräparaten zwar manche Details wahrzunehmen, erfährt aber nichts über die Ablagerung des Glykogens, weil dieses ungefärbt nicht erkannt wird. Färbt man mit Jod, um sich dasselbe sichtbar zu machen, so sieht man die Zelle in ihrer ganzen Ausdehnung die braune Farbe annehmen und muss abermals auf eine genauere Untersuchung verzichten. Man erhält den Eindruck, als sei die ganze Zelle mit Glykogen durchtränkt.

Weit mehr Befriedigung gewährt dagegen die Untersuchung gehärteter und in feine Schnitte zerlegter Leber.

2. Untersuchung gehärteter Leber.

Die Bilder, welche diese darbietet, sind, wie das ja zu erwarten ist, je nach der Härtungsmethode, je nach Thierspecies und nach Thätigkeitsphase der Leber erheblich von einander abweichend. Da ich nur Lebern mit grösserem oder geringerem Glykogengehalt und nur von einer sehr beschränkten Zahl von Species (Schaf, Hund, Kaninchen, Frosch) untersucht habe, so muss ich von einem Eingehen auf die beiden letzteren Punkte Abstand nehmen, was ich um so eher thun kann, als ja vorzügliche Arbeiten darüber von Barfurth und Afanassiew vorliegen.

Was den ersteren Punkt dagegen anbetrifft, so mag Folgendes hervorgehoben sein.

a) Härtung in absolutem Alkohol.

Die polygonal-rundlichen, sehr grossen Leberzellen (durchschnittlich maassen dieselben beim Schaf 500—700 μ im optischen Querschnitt) lassen nach Färbung mit Alauncarmin, Haematoxylin-Eosin oder am besten mit Säurefuchsin eine mehr hyaline innere und eine tingirbare äussere Zone unterscheiden, sodass das Lebergewebe besonders bei nicht scharfer Einstellung einem Gitter nicht unähnlich sieht. Mit Immersion betrachtet, löst sich die Randzone in feine, verschieden grosse Körnchen auf, die sich derart in das

Innere fortsetzen, dass sie in ihrer Gesammtheit ein an verschiedenen Stellen verschieden weitmaschiges Netz bilden. Ein aus continuirlichen Fäden bestehendes Netzwerk, wie man es nach Härtung in Osmiumsäure beobachtet und wie es von Langley beschrieben wurde, wird man nach Fixiren mit Alkohol kaum zu Gesicht bekommen.

Färbt man die Schnitte in verdünnter Lugol'scher Lösung und überträgt sie dann in Farrant'sches Gummi, dem man ebenfalls Jodjodkalium zugesetzt hat, so wird man bei starker Vergrösserung das Glykogen in der Regel als amorphe Masse die von dem Plasma freigelassenen Räume des Zellleibes einnehmen sehen. Man erhält den Eindruck, als gleiche die Leberzelle einem Schwamm, der das gelöste Glykogen in sich aufgesogen hat.

Nur zuweilen, wenn man sich sehr starker Vergrösserungen, am besten der homogenen Immersion, bedient, wird man eine schon von Kayser und Heidenhain gemachte Beobachtung bestätigen können. Man sieht nämlich in den einzelnen Zellen, in denen das Glykogen nicht sehr reichlich vorhanden ist, dasselbe in Form von Kugeln, von denen oft sehr feine, staubförmige Tröpfchen abgesprengt sind, auftreten. Je länger man nach dieser Form der Ablagerung sucht, um so mehr wird man die Ueberzeugung gewinnen, dass sie nicht ein Produkt des Zufalls ist, sondern die Regel darstellt. Man kann sich des Gedankens nicht erwehren, dass in allen den Fällen, in welchen dieser Typus nicht beobachtet wird, nur dem Umstande die Schuld zuzuschreiben ist, dass jenes Netz von Protoplasma sich allzu innig an das Glykogen anschmiegt, sodass die Conturen des letzteren nicht gesehen werden können. Bedient man sich statt der Lugol'schen Jodlösung nach dem Vorschlag Cl. Bernard's einer Auflösung von Jod in Eisessig zur Färbung des Glykogens, so wird man die Kugeln und Schollen häufiger bemerken, weil der Eisessig die eiweissreiche Zwischenschicht von Protoplasma durchsichtiger macht. Ferner kann man durch Auflösung kleiner Stückchen einer gehärteten Leber in alkoholischer Kalilauge die Schollen zur Darstellung bringen, wie Cl. Bernard[1]) das schon an embryonalen Geweben zu thun pflegte.

1) Cl. Bernard, Sur une nouvelle fonction du placenta.

Nie vermag man an diesen Glykogenschollen eine Structur, etwa concentrische Schichtung, Streifung oder Granulirung zu bemerken, sondern wird sie stets je nach dem Grade der Tinction mehr oder weniger diaphan und völlig homogen finden. Nie wird man ferner nach Alkoholhärtung diese Gebilde anderswo, wie innerhalb der Leberzellen antreffen. Die Grösse variirt von derjenigen grosser Kokkenarten bis zur Ausdehnung von 2, selbst 3 Blutkörperchen.

Dass es sich hierbei in der That um Glykogen handelt, geht daraus hervor, dass nach Digestion der Schnitte mit filtrirtem Speichel die fragl. Objekte verschwunden sind. Nur äusserst selten wird man auch jetzt noch bei enger Blende dieselben als zarte farblose Tröpfchen aufzufinden im Stande sein.

b) Härtung in wässerigen Flüssigkeiten.

Vom besonderen Interesse musste es sein, zu erfahren, wie sich das mikroskopische Bild der Leberzelle nach Härtung in solchen Mitteln ändern würde, die als glykogenabspaltend im Sinne Fränkel's anzusehen sind. Als Repräsentant dieser Mittel kann man die Trichloressigsäure ansehen. Ich bediente mich zum Zweck der Härtung einer 5%igen Lösung derselben, welche ich auf Leberstückchen von etwa $^1/_2$—$^3/_4$ cm Seitenlänge 1—3 Tage einwirken liess. Die Nachhärtung erfolgte in Alkohol, die Einbettung in Celloïdin. Es zeigte sich, dass die Härtung in Trichloressigsäure für histologische Zwecke nicht sehr geeignet ist. Das Gewebe wird oft so zähe, dass es unter dem Messer knirscht und sich nur schlecht in feinere Schnitte zerlegen lässt. Auch sind die Structurverhältnisse der Leber nicht so conservirt, dass das Auge des Histologen sie mit Befriedigung betrachtet. Nichtsdestoweniger sind die Resultate, welche diese Härtungsmethode liefert, für die vorliegende Frage lehrreich genug.

Zunächst muss es auffallen, dass so dargestellte Präparate die Tinction mit Carmin, Säurefuchsin oder Eosin viel ausgedehnter annehmen, als Schnitte, welche nur mit Alkohol in Berührung kamen. Nach der gitterartigen Anordnung des färbbaren Plasmas sucht man hier vergeblich, da die Leberzellen fast in ihrer ganzen Ausdehnung gleichmässig gefärbt und granulirt erscheinen. Dazu kommt, dass die Zellgrenzen undeutlich und verwischt sind, ähnlich wie sie von

Afanassiew[1]) bei Lebern von Hungerthieren oder nach Fütterung der Thiere mit Fibrin beobachtet wurden. Die einzelnen Zellen sind weit kleiner als nach Alkoholhärtung. Sie messen durchschnittlich 200—350 □ μ in der Flächenansicht, also kaum die Hälfte der in Alkohol gehärteten Zellen.

Durchmustert man aufmerksam die Schnitte bei hinreichender Vergrösserung, so kann man nicht selten, besonders in den interacinären Blutgefässen, hyaline äusserst zarte Kugeln liegen sehen, die man leicht für Blutkörperchen zu halten geneigt ist. Doch kann man sich davon überzeugen, dass man es nicht mit solchen zu thun hat, wenn man mit Eosin färbt, wobei die fragl. Gebilde nicht, wohl aber bekanntlich die rothen Blutkörperchen gefärbt werden. Auch muss die sehr verschiedene Grösse und Form auffallen, welche diesen Tropfen zukommt. Oft scheint eine Anzahl solcher Tropfen zu einem maulbeerartigen Gebilde oder zu einem länglichen, an mehreren Stellen buckelartig aufgetriebenen Conglomerat confluirt zu sein.

Färbt man mit verdünnter Lugol'scher Lösung oder Jodeisessig, so nehmen alle diese Gebilde die charakteristische rothbraune Farbe an, während die Blutkörperchen sich nur dunkelgelb färben. Jetzt erkennt man auch, dass nicht nur die grösseren Gefässe solche Gebilde einschliessen, sondern dass dieselben auch in und zwischen den Leberzellen, also in den intraacinären Capillaren gefunden werden können.

Neben diesen distincten Körnern sieht man auch noch fast alle Zellen sich mehr oder weniger intensiv braun färben, ohne dass man bestimmte Contouren des Substrates der braunen Farbe aufzufinden vermag.

Woraus bestehen diese Tropfen und woher stammen sie? Dass sie zum grossen Theil aus Glykogen bestehen, wird durch die charakteristische Jodfärbung wahrscheinlich gemacht und durch das Ausbleiben dieser braunen Färbung nach Digestion mit filtrirtem Speichel bewiesen.

Indessen, es lässt sich zeigen, dass die Körner noch einen zweiten Componenten, den ich nach Ehrlich's Vorgang als Träger-

1) Afanassiew, a. a. O.

substanz des Glykogens bezeichnen werde, in sich schliessen. Diese Trägersubstanz, die man an in Alkohol gehärteten Lebern, wie bereits erwähnt, wegen der ungünstigen Lagerung nur ganz ausnahmsweise zur Darstellung bringen kann, lässt sich nach Trichloressigsäurehärtung sehr gut demonstriren. Man verfährt zu dem Zweck am besten so, dass man sich aus einem Leberstücke viele Serienschnitte herstellt und an einem derselben nach einem Gefässquerschnitt sucht, der eine charakteristische, leicht wieder zu erkennende Form oder Lage besitzt. Hat man das Glück, gerade in diesem Gefässe die mit Jod gefärbten Gebilde zu finden, so überträgt man die übrigen Schnitte in filtrirten Speichel, um nach einigen Stunden mehrere derselben in Jod zu färben und zu untersuchen. Fast regelmässig wird man in dem wiedererkannten Gefässe sehr zarte, völlig diaphane Kugeln, welche die Jodfärbung nicht angenommen haben, antreffen. Man überzeugt sich leicht, dass dieselben weder mit Carmin, Eosin, Fuchsin, noch mit Bismarckbraun zu färben sind. Ich möchte sie deswegen nicht als völlig identisch erachten mit den Kugeln, welche Ehrlich in der Niere eines Diabetikers fand, da dieselben auf Jodzusatz sich gelb färbten.

Bei der Beschreibung der Ablagerung des Glykogens im Embryo werde ich noch ausführlicher auf diese Trägersubstanz zurückkommen, da die embryonalen Organe weit geeignetere Objekte für die Untersuchung derselben darstellen.

Erinnern wir uns an die Eingangs hervorgehobene Eigenschaft der Trichloressigsäure, die Gewebe stark schrumpfen zu machen, und vergegenwärtigen wir uns die aus dieser Eigenschaft deducirten nothwendigen Folgen, nämlich ein Zersprengen der das Glykogen umschliessenden Plasmaschicht, so wird uns das Vorkommen der Glykogenkugeln in den Capillaren und grösseren Gefässen nicht allzusehr befremden. Je eine Kugel stellt den nach Trichloressigsäurewirkung ausgepressten Glykogenbestand einer Zelle oder einen Theil desselben dar. Es wäre entschieden falsch, etwa anzunehmen, diese Gebilde seien durch die auf die Trichloressigsäurehärtung folgende Alkoholbehandlung bewirkte Niederschläge von Glykogen, welches vorher gelöst war. Denn einmal verbietet die Existenz der Trägersubstanz eine solche Annahme und zweitens

wird das Glykogen nie als diaphane Masse in Tropfenform, sondern als körniges, molekulares Gerinnsel vom Alkohol niedergeschlagen, wovon man sich leicht überzeugen kann, indem man Stückchen von Hollundermark mit Glykogenlösung durchtränkt und später mit Alkohol behandelt, um sie sodann in feine Schnitte zu zerlegen.

Da Fränkel der Trichloressigsäure die Wirkung zuschreibt, aus der Muttersubstanz des Glykogens dieses abzuspalten, so muss er zugeben, dass diese in den Gefässen liegenden Kugeln aus schon abgespaltenem Glykogen bestehen; denn sie sind ja ein Produkt der Säurewirkung. Da man an denselben nun alle jene physikalischen und, soweit das möglich, auch chemischen Eigenschaften wiederfinden kann, welche jener nach Alkoholhärtung in den Zellen eingeschlossenen Substanz zukommen, so gewinnt die Annahme, dass auch letztere schon fertiges Glykogen sei, sehr an Wahrscheinlichkeit.

Die Resultate nach Härtung in Sublimat, Chromaten, Picrinsäure und Osmiumsäure gleichen im Wesentlichen denen nach Trichloressigsäurehärtung; nur sind die Glykogenschollen in den Gefässen nach keinem dieser Mittel so zahlreich vorhanden, wie nach Trichloressigsäure. Am ehesten trifft man sie noch nach Härtung in Chrom- und Pikrinsäure, fast nie nach Anwendung von Sublimat. Nach letzterem Mittel sind ausserdem die Zellen auch bedeutend grösser und nähern sich in ihrem Aussehen und ihren Dimensionen den Zellen nach Alkoholhärtung. Osmiumsäure lässt besonders den Plasmaring, sowie das intracelluläre Plasmanetz deutlich hervortreten.

II. Organe von Embryonen.

Die Organe der Embryonen und niederen Thiere sind für das Studium der Glykogenablagerung in den Geweben weit besser geeignet, als die Leber erwachsener höherer Vertebraten, deren Zellen neben der Aufgabe Glykogen, oder deren Muttersubstanz aufzustapeln, noch andere Functionen zu verrichten haben, wodurch der Bau derselben ein viel complicirterer wird, als bei den glykogenführenden Zellen der Embryonen. Es kann aus diesem Grunde nicht auffallen, dass bei weitem die meisten Forscher, welche sich mit der Histo-

chemie des Glykogens befassten, sich mit Vorliebe diesem Objekte zugewendet haben.

Arbeiten über das Vorkommen des Glykogens beim Embryo wurden in grosser Anzahl geliefert. Ich nenne nur folgende Autoren: Cl. Bernard[1]), Rouget[2]), M. Donel[3]), Barfurth[4]) und Marchand[5]).

Indem ich bezüglich deren Resultate auf die Arbeit Barfurth's verweise, woselbst auf dieselben gebührende Rücksicht genommen wird, werde ich zunächst, ohne auf die Verschiedenheit des Vorkommens in den einzelnen Geweben näher einzugehen, dasjenige, was überhaupt von der Form, Consistenz und dem Aussehen des in dem Gewebe liegenden Glykogens bekannt ist, recapituliren. Dabei werde ich mich mit Uebergehung älterer Angaben darauf beschränken, die Ansichten der neueren Untersucher, soweit sie für die vorliegende Frage von Werth sind, kurz anzuführen.

Marchand sah in dem von ihm beschriebenen Falle am frischen Objekte schon ohne Jodfärbung „grosse, durchscheinende, helle, hyaline Kugeln oder Tropfen". Indem er dieselben dem Aussehen nach mit Fetttröpfchen vergleicht, fährt er fort: „Diese Kugeln lagen theils frei, theils waren sie in Zellen eingeschlossen, welche dadurch aufgetrieben und gequollen erschienen . . . . Nicht selten fanden sich auch mehrere solcher Tropfen zusammen vor, welche dann auch confluirten und unregelmässige Klumpen bildeten." Weiterhin heisst es dann: „bei Wasserzusatz sah man von dem Gewebe Ströme einer zähflüssigen, farblosen Substanz sich in die umgebende Flüssigkeit ergiessen und mit derselben vermischen, während sich die freien und in den Zellen eingeschlossenen hyalinen Kugeln allmählich

1) Cl. Bernard, De la matière glycogène considérée comme condition de développement de certains tissus chez le foetus avant l'apparition de la fonction glycogenique du foie.

2) Rouget, Journal de la physiologie, 1859.

3) M. Donel, Recherches sur la substance amyloïd de quelques tissus du foetus. Journal de la physiol., 1883.

4) Barfurth, a. a. O.

5) Marchand, Ueber eine Geschwulst aus quergestreiften Muskelfasern mit ungewöhnlichem Gehalte an Glykogen, nebst Bemerkungen über das Glykogen in einigen fötalen Geweben. Virchow's Arch. 1883.

auflösten." Mit Jod behandelt färbten sich die Kugeln braun, aber auch die Untersuchungsflüssigkeit nahm nach einiger Zeit eine röthlich-braune Farbe an, was Marchand dem Umstande zuschreibt, dass jene aus Glykogen bestehenden Kugeln sich auflösten.

Auch bei normalen embryonalen Muskeln sah er neben den Muskelfasern freie Glykogenkugeln, die zum Theil sicherlich aus dem Innern der Fasern stammten, da er beobachten konnte, wie einige derselben aus zerrissenen Fasern austraten. Er schreibt diesen Kugeln die Consistenz eines festen Colloïdkornes zu und will öfters radiäre Spalten an ihnen bemerkt haben. Nach Zusatz wässeriger Jodlösung seien sie erst gequollen, um sich dann nach Platzen einer Membran zu lösen. Ein Diffundiren der zähen Glykogenflüssigkeit durch die Muskelsubstanz, wie es von Ranvier[1]) beschrieben wurde, konnte Marchand niemals beobachten.

Er fasst sein Urtheil über die Art des Vorkommens des Glykogens im Gewebe in folgender Weise zusammen: „Aus dem beschriebenen Verhalten geht mit Sicherheit hervor, dass das Glykogen .... in weicher, flüssiger Form existirt. Die Form des Glykogens ist lediglich durch die umgebenden Theile bedingt." Dem fügt er sodann noch hinzu, dass das zähflüssige Glykogen zwar in der protoplasmatischen Flüssigkeit quelle, sich mit derselben aber nicht mische. Es gleiche in seinem Verhalten sehr dem Mucin der Becherzellen.

Alexander Schiele[2]) findet das Glykogen überall höchst wahrscheinlich von zähflüssiger Consistenz. Er sah Glykogenpartikelchen in der Flüssigkeit rollen, ohne dass dieselben sich auflösten. Barfurth[3]) spricht sich in dem einleitenden Theile seiner Abhandlung folgendermaassen aus: „Es (das Glykogen) findet sich sehr häufig in zähflüssigen Tropfen oder unregelmässigen, tropfenähnlichen Massen, die bei reichem Gehalt an Glykogen den ganzen Zellleib diffus durchdringen können. Sehr häufig findet man aber auch nur einen Theil der Zelle gewissermaassen von Glykogen durch-

1) Ranvier, Traité technique d'Histologie.

2) A. Schiele, Das Glykogen in normalen und pathol. Epithelien. Diss. Bern, 1880.

3) Barfurth, a. a. O.

tränkt, einen andern ganz frei davon." Weiterhin äussert er sich in ähnlicher Weise, indem er ausführt, das Glykogen müsse als kleisterähnlich gequollene Masse im Plasma eingeschlossen vorkommen und werde je nach der Lage durch die wasserentziehende Wirkung des Alkohols in Form von glänzenden Körnern, Schollen oder unregelmässig gestalteten Einlagerungen gefällt. Indem er sodann auf die Ansicht Ehrlich's, das Glykogen sei an eine Trägersubstanz gebunden, zu sprechen kommt, schliesst er sich derselben völlig an und entscheidet die Frage, ob der Träger aus Eiweiss oder einem Kohlenhydrat bestehe, mit Wahrscheinlichkeit zu Gunsten des ersteren. Wenn man die fragl. Objecte mit Jodglycerin färbe, so erhalte man zuerst nur eine gelbe und dann erst die braune Farbe, was so zu verstehen sei, dass sich die Eiweissfärbung eher als die Verbindung des Jods mit Glykogen vollziehe. Ueber die Löslichkeit des Glykogens resp. der Trägersubstanz erfahren wir nur, dass die Schollen, Körner oder Kugeln nach allen Härtungsmethoden erhalten blieben.

Ehrlich schreibt der Trägersubstanz je nach dem Orte, wo sie vorkommt, variable Löslichkeit zu. Afanassiew[1]), dessen Angaben sich nur auf die Leber beziehen, spricht sich nicht direct über die Consistenz resp. die physikalischen und chemischen Eigenschaften aus, welche dem Glykogen an seiner ursprünglichen Lagerstätte zukommen; doch macht er gelegentlich einige Bemerkungen, aus welchen man Rückschlüsse auf diese Frage thun kann. Er berichtet, dass Stücke glykogenreicher Leber, in Lugol'sche Lösung gelegt, einen schwarzbraunen Niederschlag um sich hervorgerufen hätten. „Wahrscheinlich fallen kleine Partikelchen des Lebergewebes ab und geben mit Jod die Reaction auf Glykogen."

Auch erwähnt er, dass das Glykogen mit alkoholischer Bismarckbraunlösung gefärbt werden könne.

Neumann[2]) schreibt: „Als Substrat der Färbung zeigt sich eine dem Protoplasma der Zelle angehörige Substanz, welche entweder nur einzelne Theile der Zellen einnimmt oder diffus über

1) Afanassiew, a. a. O.

2) Neumann, Die Jodreaction der Chorda- u. Knorpelzellen. Schultze's Arch. Bd. 14.

den ganzen Zellkörper verbreitet ist.“ Auch Neumann hält „die etwas glänzende Masse“ von höchst wahrscheinlich zähflüssiger Consistenz und beschreibt, wie ein Tropfen derselben aus einer Enchondromzelle hervorgetreten sei.

Nach dieser Uebersicht mögen nunmehr meine eigenen Beobachtungen an embryonalen Organen folgen.

Was zunächst die Verbreitung des Glykogens im fötalen Organismus und seiner Adnexe anbelangt, so kann ich alle Angaben Barfurth's bestätigen. Ich fand es in den Deciduazellen der Meerschweinchenplacenta, den Epithelwucherungen des amniogenen Chorions beim Rindsembryo, in den Excrescenzen des Nabelstrangüberzuges, im ganzen Integument incl. den Klauen, ferner in den Epithelien des Respirations- und Intestinaltractus, der uropoetischen und Genitalorgane, der Tuba Eustachii, der Speicheldrüse und des Pankreas, ferner in den Knorpelzellen und in der Skelett- und Herzmuskulatur. Nie konnte ich es in der Nervensubstanz und in den Gefässen, nie ferner im Knochen und den serösen Häuten nachweisen.

Abweichend von der bisher scheinbar allgemein angenommenen Ansicht, dass auch das Bindegewebe bei den höheren Wirbelthieren frei von Glykogen sei, muss ich jedoch betonen, dass ich mich stets vom Gegentheil zu überzeugen Gelegenheit hatte. Sowohl im interstitiellem Bindegewebe der Lunge von 15—20 cm langen Rindsembryonen, als auch im Bindegewebe des sich entwickelnden Skelett- und Herzmuskels, sowie in jenen Theilen der bindegewebigen Hirnumhüllung, aus welcher sich späterhin die Deckknochen entwickeln, fand ich regelmässig Glykogen.

1. Glykogen in Epithelien.

Da das Glykogen in allen Epithelien fast in derselben Weise abgelagert ist, so mag es genügen einige Beispiele anzuführen. Als das bei Weitem geeignetste Object zum Studium muss die Epithelauskleidung des Rumen, Reticulum und Psalterium von Embryonen der Wiederkäuer, sowie das Epithel der Bronchialverzweigungen bezeichnet werden. Auch Quer- und Tangentialschnitte der Chorionzotten sind sehr instructiv.

Die Epithelzellen der drei ersten Mägen der Wiederkäuerembryonen sind in ihrem Aussehen, und das gilt in ähnlicher Weise auch für alle anderen glykogenführenden embryonalen Epithelien, den Fett- oder Chordazellen äusserst ähnlich. Sehr plasmaarm lassen sie nach Färbung in wässerigen Tinctionsmitteln ausser einer zarten Membran nur einen bläschenähnlichen Kern erkennen; von Protoplasma sieht man sehr oft weder an Schnitten gehärteter Präparate noch an frisch in physiologischer Kochsalzlösung zerzupften Objecten irgend etwas. Nur selten kann man in den Zellen der tieferen Schicht nach Carmin- oder Eosinfärbung reichlichere Massen eines granulirten rothgefärbten Plasmas wahrnehmen. Färbt man Schnitte von Organen, die in Alkohol, Sublimat, Chromaten, Pikrin- oder Trichloressigsäure gehärtet und dann zwecks der Celloidineinbettung in Alkohol entwässert wurden, mit Jodjodkaliumlösung, so kann man sich leicht von der Art der Glykogenablagerung überzeugen. In allen jenen Zellen, welche nach Färbung in Carmin den Charakter der Chordazellen darbieten, sieht man schwarz bis rothbraun gefärbte Tropfen von sehr variabler Grösse und Gestalt. Oft ist die Zelle durch einen einzigen Tropfen völlig ausgefüllt, oftmals liegen neben einem oder mehreren grösseren Tropfen eine grosse Anzahl feiner und feinster Kügelchen. Oft auch erkennt man nur einen feinkörnigen braunen Inhalt in den Epithelzellen. Darneben findet man, wenn auch nur selten, Zellen, welche eine diffuse Braunfärbung angenommen haben.

Nimmt man statt der Jodjodkaliumlösung Jodeisessig zur Färbung, so schrumpfen diese Kugeln nicht, wie man erwarten könnte, da der Eisessig das Glykogen fällt, sondern sie quellen etwas auf, sodass etwa vorhandene Risse, die gelegentlich in den Kugeln beobachtet werden, verschwinden. Das vorher oftmals unregelmässig gestaltete Gebilde strebt nach Eisessigzusatz Kugelgestalt anzunehmen.

Hat man sich erst über diese Art der Ablagerung orientirt, so wird man bei enger Blende das Glykogen auch ohne Jodfärbung bald als hyaline, schollige Masse, bald als Kugeln mit sehr zarten Contouren wieder aufzufinden vermögen. Diese Schollen sind mit alkoholischer Bismarckbraunlösung nur schwach, mit Carmin, Eosin,

Saffranin, Fuchsin und Haematoxylin gar nicht zu färben. Auch schwärzen sie sich nicht nach Imprägnation mit Silbernitrat am Sonnenlicht.

Um zu entscheiden, ob diese Schollen reines Glykogen oder Glykogen plus Trägersubstanz sind, habe ich Schnitte mit filtrirtem Speichel behandelt und nach verschieden langer Zeit in Jodlösung beobachtet. Sowohl an Schnitten der Lunge, des Blättermagens, wie auch von Chorionzotten konnte ich constatiren, dass selbst nach sehr langer Digestion mit Speichel viele nunmehr mit Jod gar nicht oder nur schwach gelb zu färbende Kugeln zurückblieben. Oftmals konnte ich, wenn die Saccharificirung des Glykogens noch keine vollkommene war, beobachten, dass das Centrum einer oder mehrerer Kugeln braun gefärbt wurde, während die Peripherie farblos blieb. An grösseren Schollen vermag man ausserdem bei schwacher Vergrösserung, wenn man einen Druck mittelst der Nadel auf das Deckgläschen ausübt, leicht zu beweisen, dass die fraglichen Gebilde zähflüssig sind und einen gewissen Grad von Elasticität besitzen, denn sie kehren nach Aufhören des Druckes in ihre ursprüngliche Form zurück.

Man könnte ja nun annehmen, die nicht färbbare Substanz nach Speichelbehandlung sei Achroodextrin, durch welche Annahme die Existenz einer Trägersubstanz in Frage gestellt würde, weil dieses Achroodextrin durch Speichel neben Maltose aus dem Glykogen entsteht. Die Annahme ist bei der Eigenschaft des Achroodextrin's, schlecht zu diffundiren, an Celloidinpräparaten nicht ohne Weiteres von der Hand zu weisen. Wohl aber wird sie hinfällig, wenn man uneingebettete Präparate auf diese Richtung hin untersucht und sich überzeugt, dass auch hier nach Speicheleinwirkung ein zartes, nicht färbbares Gebilde zurückbleibt, sofern man durch Alkohol für eine Schrumpfung der gequollenen Trägersubstanz Sorge trug.

Zerzupft man ein Stückchen einer embryonalen Lunge, Chorionzotte oder eines Darmes in verdünnter Lugol'sche Lösung, so sieht man neben einer Anzahl frei in der Flüssigkeit schwimmender brauner Tropfen die glykogenführenden Zellen meist diffus durch das Jod gebräunt. Oftmals aber kann man beobachten, wie aus

einer Epithelzelle ein Tropfen hervorquillt und, sobald er der nunmehr hohl oder doch viel durchsichtiger erscheinenden Zelle entschlüpft ist, unter allmählichem Blässerwerden stark quillt, bis die Contouren unsichtbar werden: der Tropfen scheint aufgelöst zu sein. Wenn man diesen Augenblick abwartet und nun Alkohol unter dem Deckgläschen zufliessen lässt, so kann man, falls der Flüssigkeitsstrom das Gesichtsfeld nicht zu sehr verändert, bemerken, dass der bereits dem Auge entschwundene Tropfen allmählich wieder deutlicher wird und schrumpft, um schliesslich eine dem ursprünglichen Gebilde nicht allzu unähnliche Gestalt und Grösse wieder zu gewinnen. Zusatz von Trichloressigsäure vermochte diese Restitution ebensowenig herbei zu führen, wie andere daraufhin untersuchte Flüssigkeiten; wohl aber konnte ich in derselben ein starkes Quellen oder Zerfliessen der Tropfen beobachten. In Glycerin, Farrant'scher Gummilösung und Eisessig findet ein so auffälliges Quellen nicht statt. In Farrant'scher Flüssigkeit habe ich Präparate mehrere Monate aufbewahrt, ohne dass ein Undeutlichwerden der Glykogentropfen zu bemerken gewesen wäre. Ich glaube annehmen zu müssen, dass überhaupt ein völliges Lösen der Tropfen in wässerigen Flüssigkeiten, wie es allgemein vorausgesetzt zu werden scheint, nicht stattfindet, sondern nur ein sehr starkes Quellen, welches verursacht, dass das Brechungsvermögen der Trägersubstanz der des umgebenden Mediums gleich wird, wodurch bei dem Fehlen irgend einer Farbendifferenz das Unsichtbarwerden veranlasst wird. Wie sollte man es sonst erklären, dass nicht nur in Zellen eingeschlossen, sondern auch frei im Lumen des Darmkanals, der Bronchien oder gar des Nierenbeckens, welch' letzteres doch beständig von Flüssigkeit durchspült wird, diese Kugeln nach jeder Art der Härtung, sofern nur eine Behandlung mit Alkohol nachfolgt, gefunden werden. Die Nachbehandlung mit Alkohol ist eben nöthig, um die zuvor gequollenen Massen wieder schrumpfen zu machen. Aus diesem Grunde vermag ich mich der Ansicht von Marchand ebensowenig anzuschliessen als derjenigen anderer Untersucher, welche die Löslichkeit dieser zum Theil aus Glykogen bestehenden Kugeln annehmen. Ich finde dagegen in meiner Anschauung eine Stütze in der Beobachtung

Schiele's[1]), welcher berichtet, dass frei in der Flüssigkeit schwimmendes Glykogen sich nicht löste.

Während Marchand auf der einen Stelle beschreibt, wie sich die Gebilde als Ströme zähflüssiger Masse mit dem Wasser mischten unter gleichzeitigem Auflösen der Kugeln, lässt er auf einer anderen ein zartes Häutchen zurückbleiben und an einer dritten Stelle spricht er davon, dass das Glykogen in der protoplasmatischen Flüssigkeit quelle, ohne sich aber damit zu vermischen. Vielleicht darf man unter jenen zarten Häutchen die zurückbleibende Trägersubstanz vermuthen, die oft in der That eine Membran vorzutäuschen vermag.

Wenn ferner Afanassiew von einem schwarzbraunen Niederschlage berichtet, der beim Einlegen von Stücken glykogenreicher Leber in Lugol'sche Lösung entstehe, so ist darunter vermuthlich nichts anderes zu verstehen, wie die unlösliche, herausgequollene Trägersubstanz, welche mit Jodglykogen imbibirt war.

Wenn man an einem Häkchen ein Stück eines zuvor mit einem Messer oberflächlich zerkratzten embryonalen Netzmagens in ein Probirröhrchen mit verdünnter Lugol'scher Lösung einhängt, so kann man beobachten, dass sich ein brauner Bodensatz bildet, der, mit der Pipette auf einen Objectträger gebracht, durch Alkohol zu Klumpen oder netzartigen Gerinnseln zusammenschrumpft. Das sind die ungelösten, confluirten Glykogengebilde.

Ehrlich steht nicht ganz auf dem hier angeführten Standpunkte, doch nähert er sich demselben sehr, indem er das Vorkommen einer in Wasser unlöslichen Modification des Glykogens annimmt und der Trägersubstanz je nach dem Ort ihres Vorkommens verschiedene Löslichkeit zuschreibt.

Was die topographische Vertheilung des Glykogens in den verschiedenen Epithelien anbetrifft, so ergeben sich einige, den jeweiligen Orten charakteristische Eigenthümlichkeiten in Farbe, Masse, Verbreitung u. s. w., die zu kennen für das Verständniss späterer Ausführung erforderlich ist. Abgesehen davon haben aber einige Beobachtungen auch ein anderes, mit der vorliegenden Frage nicht verknüpftes Interesse.

1) Vgl. S. 444.

Wenn man Schnitte von einem Vormagen eines Wiederkäuerembryos, von der Schleimhaut der Nasen- oder Mundhöhle, vom äusseren Integumente oder auch von den Epithelwucherungen des amniogenen Chorions, welche senkrecht zur Fläche geschnitten sind, in Jodfarrant untersucht, so kann man, falls der Embryo nicht allzu jung war, fast an jedem Schnitte einen Unterschied in dem Aussehen des Glykogens in den tieferen und oberflächlicheren Lagen constatiren. Während dasselbe in den tieferen Zellschichten meist in grossen Tropfen liegt und nach Jodfärbung fast schwarze Farbe annimmt, sieht man die oberflächlicheren Zellen in der Regel mit vielen kleinen Tröpfchen angefüllt, welche einen rothbraunen, gebrannter Sienna ähnlichen Farbenton annehmen. In der tieferen Schicht sieht man neben den Zellen mit grossem, tropfenförmigem Inhalt wohl auch solche, in denen die braungefärbte Substanz sich rings der Zellenwandung anschmiegt, den Hohlraum gleichsam auspolsternd, eine Erscheinung, die in oberflächlichen Zelllagen zur Ausnahme gehört. Von diesem Verhalten überzeugt man sich am leichtesten an Schnitten von Klauen und Nasenschleimhaut.

Färbt man die Schnitte anstatt in Jod, in Hämatoxylin oder Carmin, so kann man unschwer auch an den Zellen selbst ein je nach der Schicht, in welcher sie liegen, verschiedenes Verhalten beobachten. Die allertiefste Schicht, welche, wie Controlpräparate mit Jodfärbung lehren, kein oder nur wenig Glykogen enthält, ist plasmareich und trägt den Charakter des Rete Malpighi. Darauf folgen, wie beim äusseren Integument Zellen, welche ärmer an Plasma sind und mehr gedunsen und kugelig aussehen. Je mehr wir uns bei dieser Prüfung der Oberfläche nähern, um so gedunsener, kugeliger und plasmaärmer werden die Zellen, um an der Oberfläche selbst nur noch Zellfragmente, geöffnete Hohlräume, darzustellen. Auch der Kern zeigt, je näher die Zelle, welcher er angehört, der Oberfläche liegt, um so mehr die Zeichen der beeinträchtigten Lebensfähigkeit. Während die Kerne der tieferen Schicht sich gut färben und chromatinreich sind, findet man diejenigen, welche an der Oberfläche liegen, sowohl ärmer an Chromatin, als auch in ihrer Form verändert, entweder gequollen oder geschrumpft. Anders ist das Verhalten bei den meist einschichtigen Cylinder-

epithelien der Niere, Lunge und des Darmes. Hier hat es mir den Eindruck gemacht, als würde das Glykogen mit Erhaltung des Epithels, wie bei den Becherzellen das Mucin, allmählich eliminirt. Man sieht nämlich häufig neben den Zellen, welche völlig frei von Glykogen sind, auch solche, welche das Glykogen nur an der Basis unterhalb des Kernes und wiederum andere, welche es nur an der dem Lumen zugekehrten Seite, also oberhalb des Kernes einschliessen. Im Lumen selbst aber findet man sowohl in der Lunge, wie im Darm und den Sammelröhren resp. Becken der Niere stets reichliche Anhäufung von Glykogentropfen, die meist nicht von Zellen eingeschlossen sind. Gerade diese Kugeln sind ein vorzügliches Object für die Demonstration der Trägersubstanz.

Bekanntlich fanden schon Cl. Bernard[1]) und Rouget[2]), dass in der Niere nur die Sammelröhren und das Nierenbecken glykogenhaltige Zellen besitzen, während das eigentliche secernirende Parenchym frei davon ist. Dieses Verhalten wurde später von allen Beobachtern (Ehrlich, Barfurth, Cramer, Paschutin) bestätigt. Auch ich habe mich überzeugt, dass bei Rinds-, Kaninchen- und Meerschweinchenembryonen der verschiedensten Entwicklungsstufen diese Beobachtung gemacht werden kann.

Während Cl. Bernard sich mit dieser Beobachtung dadurch abfindet, dass er sich darauf beruft, dass auch bei anderen Drüsen nur die Ausführungsgänge, nie aber das Parenchym Glykogen führen, gibt Barfurth eine wirkliche Erklärung dieser Erscheinung. Er sagt, es werde in den eigentlichen Drüsenzellen zwar auch Glykogen gebildet, dasselbe könne aber deswegen nicht zur Ablagerung kommen, weil es bei der Thätigkeit der Drüsen verwendet werde. Die Ausführungsgänge dagegen, welche sich an den Secretionsvorgängen in den Drüsen nur passiv betheiligten, liessen eine Anhäufung des gebildeten Glykogens zustande kommen.

Ohne diese gewiss sehr einleuchtende Erklärung von der Hand weisen zu wollen, möchte ich an dieser Stelle noch einer anderen Möglichkeit, die auffallende Anordnung des Glykogens in der Niere zu erklären, Erwähnung thun. Ausgehend von der Beobachtung,

1) Cl. Bernard, De la matière glycogène etc.
2) Rouget, a. a. O.

dass es sowohl bei den Darmdrüsen, wie bei der Parotis (über das Pankreas besitze ich in diesem Punkte keine Erfahrung) ein Indifferenzstadium gibt, in dem von einer Sonderung in Ausführungsgang resp. Darmepithel und Drüse nicht geredet werden kann, und dass in diesem Stadium sämmtliche Epithelzellen der Drüsenanlage Glykogen führen, während bei der Niere auch in der frühesten [1]) Anlage schon das Drüsenparenchym frei von Glykogen ist, vermuthete ich, dass die Glykogenvertheilung in der Niere eine Consequenz der Entwicklung der letzteren sein könne.

Bekanntlich ist die Entwicklung der Niere noch Controverse. Nach der älteren, auch jetzt noch von vielen Embryologen festgehaltenen Anschauung soll die gesammte Niere sich aus einer Ausstülpung des Urnierenganges einheitlich durch Sprossung entwickeln. Neuere Forscher (Braun, Führbringer, Balfour, Sedgwick) neigen indess der Auffassung zu, dass sich die Niere aus zwei, genetisch verschiedenen Componenten aufbaue, einmal aus jener Ausstülpung des Urnierenganges und zweitens aus einer Wucherung des Peritonealepithels (Braun bei Reptilien). Da aber, wie wir wissen, die serösen Häute, also auch das Peritonaeum, stets glykogenfrei sind, so dürfte die neuere Ansicht über die Genese der Niere an der Vertheilung des Glykogens in derselben eine Stütze gefunden haben.

2. Glykogen in Abkömmlingen des Mesoderms.

Betreffs der Glykogenvertheilung in den Knorpelzellen habe ich dem bereits durch frühere Untersucher Bekanntgegebenen nichts hinzuzufügen.

Wohl aber bin ich über das Vorkommen von Glykogen in den embryonalen Muskeln etwas anderer Ansicht. Fast alle Forscher verlegen das Glykogen fast ausschliesslich in die Muskelsubstanz

1) Ich habe Rindsembryonen aus einem Stadium untersucht, in dem noch Reste der Urniere vorhanden und die Malpighischen Körperchen kaum als solche zu erkennen waren, und doch habe ich die letzteren, sowie das, was schon an Parenchym vorhanden war, stets frei von Glykogen gefunden. Von einer Differenzirung der Abführwege vom Parenchym im Sinne der Entwickelung der Darmdrüsen kann also bei der Niere keine Rede sein. Auch dürfte um so frühe Zeit die Function der noch unausgebildeten Niere kaum hinreichen, um hier die Erklärung Barfurth's in Anwendung treten zu lassen.

und lassen das interstitielle Bindegewebe frei davon sein. Sogar Barfurth, der doch von den Gastropoden her gewohnt war, die Hauptmasse des Glykogens zwischen den Muskelfasern und nicht in denselben zu finden, bezeichnet es als einen „eigenthümlichen" Befund, als er einmal in der Herzspitze eines Kaninchenfötus etwas Aehnliches beobachtet und sagt: „es findet sich also hier vorübergehend ein Sachverhältnis, was bei den Gastropoden dauernd ist." Ich vermag nicht anzugeben, welchem Umstande es zuzuschreiben ist, dass ich diesen Befund, den Barfurth als Ausnahme anführt, stets als Regel fand, mochte ich in Alkohol, Chromaten, Pikrinsäure oder Sublimat fixirt haben. Etwa anzunehmen, Barfurth habe sich täuschen lassen, ist bei den trefflichen Beobachtungen, die wir demselben verdanken und bei der Deutlichkeit, mit welcher sich mir das zwischen den Muskelfasern liegende Glykogen förmlich aufdrängte, völlig ausgeschlossen. Man wird also annehmen müssen, dass bei der Anordnung des Glykogens im Muskel gewisse, noch unbekannte Factoren, etwa das Alter, der Ernährungszustand und die Species der Embryonen von Bedeutung sind.

Auch Marchand berichtet, dass er Glykogenkugeln ausserhalb der Fasern gesehen habe, die von einer Membran eingeschlossen gewesen seien. Doch glaubt er selbst, dass dieselben aus dem Innern zerrissener Fasern stammten. Im Uebrigen stimmt das, was ich an den Muskelfasern selbst beobachtete, gut mit Marchand's Angaben. Nur sehr selten vermochte ich an gehärteten Objecten Fasern aufzufinden, die das Glykogen, wie Cl. Bernard zuerst berichtete, im Zustande der Infiltration besitzen. Die grösste Mehrzahl der Fasern präsentirte sich als eine ziemlich dünnwandige Röhre von quergestreifter Substanz, die im Innern ausser einer meist zickzackförmig geschlängelten fibrillären Masse das Glykogen in Tropfen-, Körner- oder Cylinderform einschloss. Oftmals war auch das Glykogen sehr auffällig in Form von quer verlaufenden Septen angeordnet, sodass die Faser einer Leiter nicht unähnlich war. Die Beobachtung Marchand's, dass die Tropfen aus dem Innern der Fasern austreten, ist an frischen, in Lugol'scher Lösung zerzupften Muskeln leicht zu wiederholen. Man könnte deshalb geneigt sein, auch die in dem interstitiellen Bindegewebe gehärteter Muskeln

liegenden Glykogentropfen für Kunstproducte zu halten, dadurch entstanden, dass das Glykogen, vor Nachhärtung in Alkohol aus den Fasern ausgetreten und später in den Interstitien durch Alkohol zu Kugelform coagulirt sei. Diese Auffassung muss ich indessen aus drei Gründen als unzutreffend zurückweisen. Denn man kann beobachten, dass viele dieser Glykogentropfen, gerade wie Barfurth es bei den Gastropoden als Regel fand, in den Zellen des Bindegewebes eingeschlossen sind, während sehr viele andere ohne Zweifel frei in den Lücken des Gewebes liegen. Aber auch von diesen ist es durch die beiden folgenden Gründe höchst wahrscheinlich, dass sie nicht aus den Muskelfasern stammen. Sie werden nämlich nicht nur nach Härtung der Muskeln in wässerigen Härtungsflüssigkeiten, sondern auch dann gefunden, wenn die Stücke völlig lebensfrisch in absoluten Alkohol gelegt wurden. Der Alkohol aber kann, da er das Glykogen durch seine fällende Wirkung an dem Orte fixirt, wo es ursprünglich vorhanden ist, eine Verschleppung dieser Kugeln, etwa ein Auspressen aus einem zuvor eingenommenen Hohlraum, wie ich es bei der Leber nach Härtung in Trichloressigsäure beschrieben habe, unmöglich bewirken. Andererseits ist die Auffassung, die Tropfen seien gefälltes, vorher etwa im Gewebssafte gelöst gewesenes Glykogen, durch die bereits auf Seite 441 u. 442 dargelegten Gründe sehr unwahrscheinlich. Man wird sich deshalb zu der Annahme verstehen müssen, dass diese Kugeln normaler Weise als freie Tropfen in den Gewebsspalten präexistiren.

Im interstitiellen Bindegewebe der Lunge fand ich das Glykogen nur in Zellen eingeschlossen. Das Gleiche gilt von der bindegewebigen Anlage der Deckknochen des Schädels bei Meerschweinchenembryonen.

In der Sclera und Cornea von Rindsföten sah ich viele äusserst feine, braune Kügelchen zwischen die Bindegewebslamellen eingestreut, dieselben stellenweise auseinander drängend. Ich halte dieselben für Glykogen, obwohl ich nicht versucht habe, diese Tröpfchen auf ihr Verhalten dem Speichel gegenüber zu prüfen.

Als eigenthümliche Beobachtung mag noch angeführt sein, dass ich bei zwei Meerschweinchenembryonen von etwa 5—6 cm Länge, die in Müller'scher Flüssigkeit gehärtet waren, in dem lockeren

Bindegewebe der Radix mesenterii nach Jodfärbung eine braune, äusserst zierliche Netzzeichnung beobachtet habe, die sich bei stärkerer Vergrösserung als aus hintereinander liegenden Kugeln von Glykogen bestehend erwies. Ich glaube, dass es sich dabei wohl um verschlepptes, nachträglich beim Uebertragen in Alkohol coagulirtes Glykogen in Lymphbahnen gehandelt haben wird.

Ferner mag an diesem Orte erwähnt werden, dass ich zufällig an einer mit Leberegeln (Distomum hepaticum und lanceolatum) durchsetzten Schafleber auch in diesen Entozoen reichliche Glykogenablagerungen constatiren konnte. Während die Epithelzellen dieser Thiere völlig frei von Glykogen waren, fand ich grosse Mengen dieser Substanz in den Bindegewebszellen besonders der Uterinwindungen, die ohne Jodfärbung Fettzellen zum Verwechseln ähnlich sahen.

Ueberblicken wir nun am Ende der mikroskopischen Untersuchungen noch einmal die Resultate derselben, so dürfen wir uns zur Aufstellung folgender Thesen für berechtigt erachten:

1. Das Glykogen ist im erwachsenen wie embryonalen Organismus an eine Trägersubstanz, wie das Hämoglobin an das Blutkörperchenstroma gebunden.

2. Beide Substanzen, das Glykogen sammt der Trägersubstanz sind normaler Weise in den Hohlräumen des Protoplasmas eingeschlossen. Nur beim Fötus kommen Gebilde vor, welche durch Desquamation der glykogenführenden Zellen oder nach dem Typus der Schleimsecretion der Becherzellen frei werden.

3. Eine Membran oder eine selbständige Form kommt der Trägersubstanz nicht zu, sondern sie passt sich dem disponiblen Raum an. Kommt sie, wie beim Fötus, frei vor, so nimmt sie, wie alle Flüssigkeiten, die sich mit dem Medium, in dem sie sich befinden, nicht mischen, Kugelgestalt an.

4. Die Trägersubstanz wird durch Alkohol coagulirt und quillt in wässerigen Flüssigkeiten, ohne sich darin zu lösen. Trichloressigsäure coagulirt sie nicht; deswegen kann die Trägersubstanz nicht aus gewöhnlichem Eiweiss bestehen.

Auf Grund dieser mit einigen älteren Untersuchungen in vieler Hinsicht wohl in Einklang zu bringenden Resultate können wir er-

klären, weswegen Leber oder durch Zerreiben in Alkohol hergestelltes Leberpulver in Fränkel's Versuchen so wenig Glykogen an kaltes Wasser abgab: Ich brauche nur auf die eingangs erörterten, rein physikalischen Schwierigkeiten, die der Lösung des Glykogens entgegenstehen, hinzudeuten; sie werden das Rechte treffen. Dazu kommt als zweiter Grund der Umstand, dass das Glykogen an die unlösliche Trägersubstanz gebunden, von derselben mechanisch absorbirt ist. Die Absorption kann, ohne dass man irgend welche chemischen Affinitäten zu ihrer Erklärung vorauszusetzen braucht, eine sehr innige sein, wie folgende Analoga erörtern mögen:

Trotzdem die Thierkohle für organische Farbstoffe keine chemische Affinität besitzt und besitzen kann, so ist doch jedem bekannt, wie vorzüglich dieselbe zur Beseitigung gelöster Farbstoffe aus Lösungen anderer Substanzen geeignet ist. Ferner ist es eine schon längst bekannte Erscheinung, dass Gase so innig von Glas oder blanken Metallflächen festgehalten werden, dass es selbst im Vacuum einer geraumen Zeit bedarf, bis dieselben frei gelassen werden. Ausserdem hat Krysinsky [1]) gezeigt, dass dicke Lagen von Filtrirpapier aus einer Salzlösung so viel gelöste Substanz mechanisch absorbiren können, dass reines Wasser abtropft, und die absorbirte Substanz mit Wasser nicht so leicht ausgewaschen werden kann. Auch eine von O. Nasse [2]) gefundene Erscheinung ist sehr geeignet, hier angeführt zu werden. Dieser Forscher fand, wenn er eine Glykogenlösung mit Oel schüttelte, so dass eine Rahmschicht aus Oeltropfen sich bildete, dass diese Rahmschicht 12,8% Glykogen, die darunterstehende opalescirende Lösung aber nur 2,9% Glykogen enthielt. Die Fetttropfen hatten also das gelöste Glykogen auf ihrer Oberfläche sehr stark concentrirt gemacht.

Wenn nun die Trägersubstanz unlöslich ist, und das Glykogen von derselben absorbirt wird, so kann auch das letztere nicht in Lösung gehen. Setzt man aber Agentien zu, die in irgend einer nicht näher zu definirenden Weise alterirend auf die Trägersubstanz

1) Krysinsky, Sitzungsber. d. Jen. Gesellsch. f. Med. u. Naturwissensch. f. d. Jahr 1884.

2) O. Nasse, Ueber Verbindungen des Glykogens etc. Pflüger's Archiv, Bd. 37, 1885.

einwirken, so wird das Glykogen frei gegeben, das Extract wird, wenn ich mich des einen anologen Vorgang beim Blute bezeichnenden Ausdruckes bedienen darf, lackfarben.

Wenn Fränkel glaubt, die Leber gebe nur Glykogen ab, wenn irgend ein die hypothetische Verbindung spaltendes Agens auf dieselbe einwirke, so befindet er sich mit dieser Annahme in einem Irrthum, dem er sicher entgangen wäre, wenn er seine diesbezüglichen Versuchsanordnungen mehr variirt oder sich in der einschlägigen Literatur genau orientirt hätte.

Schon die fast von jedem mit histochemischen Arbeiten über Glykogen beschäftigten Forscher hervorgehobene Thatsache, dass Schnitte von in Alkohol gehärteten Organen ihr Glykogen in Lösung gehen lassen, wenn sie zu lange in physiologischer Chlornatriumlösung oder verdünntem Glycerin belassen werden, hätte Fränkel auf seinen Irrthum aufmerksam machen können.[1]) Er müsste denn auch den Alkohol, oder die physiologische Kochsalzlösung sowie das verdünnte Glycerin zu den glykogenabspaltenden Körpern zählen.

Schon im Jahre 1873 hat Plosz[2]) erwähnt, dass man durch Auspressen gefrorener Leber ein Plasma erhalten könne, das stark glykogenhaltig sei. Ebenso gelang es ihm beim Durchspülen der Leber von der Vena portarum und den Gallengängen aus das Glykogen aus der Leber auszuwaschen. Desgleichen finde ich von Külz und Bornträger[3]) erwähnt, dass schon Gorup-Besanez und Chittenden, der erstere aus Menschenleber, der letztere aus

1) Wenn Fränkel sagt, das Glykogen löse sich aus der zerkleinerten oder zu feinem Pulver zerriebenen Leber deshalb im Wasser nicht, weil es erst durch die Darstellungsmethoden abgespalten werde, so folgere ich daraus, dass auch jene Verbindung, aus der es abgespalten werden soll, in kaltem Wasser unlöslich ist. Denn was sollte sie, Löslichkeit vorausgesetzt, ausser dem von mir betonten, rein physikalischen Hinderniss abhalten, bei so grosser Oberfläche, wie sie z. B. das Leberpulver dem Wasser darbietet, in Lösung zu gehen und später im Filtrat nach Fällung des Eiweisses mit dem Brücke'schen Reagens Glykogen zu liefern.

2) Plosz, a. a. O.

3) Külz und Bornträger, Ueber die elementare Zusammensetzung des Glykogens. Pflüger's Arch. Bd. 24 S. 19.

dem grossen Mittelmuskel von Pecten irradians Glykogen durch Extraction mit kaltem Wasser darstellten.

In dem folgenden Kapitel werde ich zu zeigen versuchen, dass es entgegen den Angaben Fränkel's sehr wohl möglich ist, aus der Leber allein durch kaltes Wasser einen erheblichen Procentsatz des überhaupt darin enthaltenen Glykogens zu extrahiren. Gleichzeitig habe ich einige ähnliche Versuche mit den Organen von Rindsembryonen angestellt.

Extrahirbarkeit des Glykogens aus den glykogenhaltigen Geweben.

A. Embryonale Organe.

Bei der Lösung der Frage, ob embryonale Organe ihr Glykogen an kaltes Wasser oder physiologische Chlornatriumlösung abgeben, war es für mich von Wichtigkeit, zuvor mich darüber zu informiren, ob bei embryonalen Organen das Glykogen ebenso labil ist, wie bei der erwachsenen Leber, oder ob es der Saccharificirung grösseren Widerstand entgegensetzt. Denn es wäre ja wohl möglich, dass das Glykogen, welches sich etwa in der Extractionsflüssigkeit gelöst hatte, durch ebenfalls in Lösung gegangenes diastatisches Ferment dem Nachweise entzogen werde.

Ich zerhackte und zerrieb, um in dieser Angelegenheit wenigstens einen Anhaltspunkt zu haben, einen Rindsembryo von 21 cm Länge und einem Gewicht von 370 g zu einem feinen Fleischbrei, der selbst bei aufmerksamer Betrachtung gröbere makroskopisch erkennbare Gewebselemente kaum noch enthielt. Diesen theilte ich in 4 Portionen. Den ersten Theil verarbeitete ich sofort, den zweiten am folgenden Tage, den dritten am zweitfolgenden Tage und den letzten am fünften Tage. Die zweite, dritte und vierte Portion standen bis zu ihrer Verarbeitung in einem durchschnittlich 7 bis 10° C. warmen Raume. Bei dem Verarbeiten verfuhr ich so, dass ich den Brei in einer Porzellanschale mit jedesmal erneuertem schwach angesäuertem Wasser so oft kochte, bis das Filtrat keine Jodreaction mehr gab. Dazu war 10—12 maliges Abkochen genügend. Die vereinigten etwa 1—1½ l betragenden Filtrate wurden bis 100 ccm auf dem Wasserbade eingeengt und, da sich beim Einengen meist abermals Eiweisskörper abschieden, filtrirt.

Nachdem das Filter gut ausgewaschen war, wurde das Filtrat ohne vorherige Ausfällung etwaiger noch in Lösung befindlicher stickstoffhaltiger Substanzen durch die doppelte Menge absoluten Alkohols gefällt, der wolkige, schwach gelbliche Niederschlag abfiltrirt, mit 60%igem und dann mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen, um sodann auf dem gewogenen Filter zuerst im Exsiccator und dann bei 110° im Luftbade getrocknet zu werden. Der zur Fällung benutzte Alkohol wurde zur Trockene verdampft und auf Zucker untersucht. Die Resultate dieses Versuches sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1.

No.	Gewicht der Portion in g	Zuckergehalt des zur Fällung benutzten Alkohols	Gehalt an Glykogen in		Zeit vom Tode bis zum Beginn der Verarbeitung	Bemerkungen
			g	%		
I	67,5	0	0,8295	1,230	einige Stunden	—
II	91,0	0	1,0830	1,190	20 Stunden	—
III	86,0	geringe Spuren	1,0780	1,250	45 „	—
IV	103,0	0,5—0,6 (polarisirt)	0,8505	0,826	93 „	gering. Fäulnissgeruch

Man sieht aus dieser Versuchsreihe, dass innerhalb 45 Stunden kein Glykogenschwund eingetreten ist, dass aber sofort eine merkliche Abnahme des Glykogens und eine Zunahme des Zuckers stattfindet, sobald Fäulniss eintritt.

Ich wurde durch dieses Resultat nicht sehr überrascht, da doch durch die Versuche von Langendorf[1]) bekannt ist, dass das diastatische Ferment beim Rindsembryo erst in Spuren auftritt, wenn dieser eine Länge von mindestens 25 cm erlangt hat, während es sich bei Kaninchen gar erst nach der Geburt bildet. Ferner berichtet Marchand[2]), dass er bei einem menschlichen Embryo sogar noch 14 Tage nach dem Tode ebenso gute Glykogenreaction erhielt, als bei einem anderen frischen Embryo. Ungeachtet dieser Erfahrung habe ich in nachfolgenden Versuchen doch fast stets Sorge dafür getragen, die Saccharificirung entweder durch relativ

1) O. Langendorf, Ueber die Entstehung der Verdauungsfermente beim Embryo. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1879, S. 102.

2) Marchand, a. a. O.

niedere Temperaturen oder dadurch zu verhindern, dass ich Embryonen wählte, die jene von Langendorf gefundene Grenze nicht überschritten (nur einmal betrug die Länge 27 cm). Allein auch bei Anwendung dieser Cautelen kam es oft vor, dass geringere oder deutlichere Spuren von Zucker nachzuweisen waren, die sich wohl erst beim Verarbeiten im geheizten Raume mögen gebildet haben.

Da mir lediglich darum zu thun war, zu untersuchen, mit welchen Flüssigkeiten das Glykogen aus den Organen zu extrahiren sei, so beschränkte ich mich in der Regel auf den qualitativen Nachweis des Glykogens vermittelst Jodjodkaliumlösung, zu der ich aus einer Pipette das zuvor bis zur sauren Reaction mit Essigsäure versetzte zu untersuchende Filtrat einfliessen liess. Man kann auf diese Weise eine hohe Empfindlichkeit der Reaction erreichen. In allen Fällen aber überzeugte ich mich, ob die braunrothe Farbe beim Erwärmen schwand und beim Erkalten wiederkehrte. Wenn ich auch nicht zu behaupten wage, jene hohe Empfindlichkeit im qualitativen Glykogennachweis erreicht zu haben, die Goldstein[1]) angibt, so überzeugte ich mich doch an reinen Glykogenlösungen von bekanntem Gehalt, dass die Methode bei einem Verhältniss von 1:2000 noch mit Sicherheit zu verwerthen ist[2]).

---

1) Goldstein, Beiträge zur Lehre von der Glykogenbildung.

2) Bei dieser Gelegenheit sei mir gestattet, auf ein Vorkommniss hinzuweisen, das wohl geeignet ist, den Untersuchenden bei einem derartigen Glykogennachweis irre zu führen. Es fiel mir nämlich auf, dass ich manchmal in der zu prüfende Lösung nach Zusatz ganz geringer Jodmengen eine deutlich blaue und erst nach Zufügen von mehr Jod eine rothbraune Färbung erhielt. Wurde die bis zum Eintritt der rothbraunen Farbe mit Jod versetzte Lösung erwärmt, so verschwand die braune Färbung bei etwa 50° und die blaue kam um so deutlicher hervor, um ebenfalls beim stärkeren Erwärmen, etwa bei 80°, zu verschwinden. Beim Erkalten erschienen die Farben in der umgekehrten Reihenfolge, wie sie verschwunden waren, wieder. Ich hatte mich bereits der Hoffnung hingegeben, ein Glykogen gefunden zu haben, das sich genau wie Amylum verhielte und wurde in dieser Ansicht noch bestärkt, da bereits Jaffe (Virchow's Arch. Bd. 36) berichtet, aus dem Gehirn eines Diabetikers sowie eines an anderer Krankheit verstorbenen Menschen ein Kohlenhydrat dargestellt zu haben, das auf Jodzusatz eine blaue Färbung gab. Nachdem ich mich lange vergeblich bemüht, diesen blaufärbbaren Körper in Substanz darzustellen, kam mir der Gedanke, er möchte eine Verunreinigung der heiss filtrirten Lösungen aus dem Filtrirpapier sein.

1. Zotten des amniogenen Chorions vom Rinde.

Versuch 2. 14./11. Die Zotten werden mit Scheere und Pincette sorgfältig von den Eihäuten abpräparirt und mit reinem Quarzsand in einer Reibschale zerrieben. Das zerriebene Gemisch wird in mehrere Theile getheilt. Ein Theil wird in kaltes Wasser, ein anderer in kalte 0,5%ige Essigsäure, ein dritter in conc. Natriumcarbonatlösung, ein vierter in 5%ige Trichloressigsäure gethan und 24 Stunden darin belassen. Nach Ablauf dieser Frist werden alle Theile filtrirt (Portion 3 filtrirt ziemlich schwer) und aus den drei ersten durch Kochen in schwach saurer Lösung die geringen Mengen Eiweiss entfernt. Alle Filtrate geben mit Jod geprüft Glykogenreaction. Ein 5. Theil wird mit zweimal gewechseltem absolutem Alkohol und darauf mit Aether behandelt. Am 2. Tage wurde das trockene Pulver 5 Stunden lang in Wasser bei Zimmertemperatur extrahirt. Die Flüssigkeit ergab nach Entfernung der Eiweisskörper deutliche Glykogenreaction.

Versuch 3. 14./12. Chorionzotten werden auf gleiche Weise wie im vorigen Versuche zerrieben und in 4 Theile getheilt. Ein Theil wird mit Wasser, ein zweiter mit 0,5%iger Essigsäure, ein dritter mit conc. Sodalösung verrieben und der vierte mittelst Alkohol zu einem Pulver verarbeitet. Die Filtrate der 3 ersten Portionen sind stark glykogenhaltig, desgleichen das Wasserextract des mit Alkohol hergestellten Pulvers. Der Rückstand des ersten Theiles, sowie das ausgelaugte Pulver der vierten Portion werden so lange mit kaltem Wasser erschöpft, als noch Glykogen im Filtrate nachzuweisen ist, um dann mit Zusatz einiger Tropfen Natronlauge zerkocht zu werden. Nach Neutralisation werden die Eiweisskörper mit Chlorwasserstoffsäure und Jodquecksilberkalium ausgefällt und das Filtrat durch Zusatz von Alkohol auf Glykogen geprüft. Portion 1 bleibt klar, Portion 4 gibt eine geringe Fällung, die abfiltrirt wird und, mit Jod geprüft, sich als Glykogen erweist. Während also die genuinen Chorion-Zotten durch Auslaugen mit kaltem Wasser zu erschöpfen sind, ist aus den durch Alkohol coagulirten Chorionzotten das Glykogen durch blosses Digeriren in Wasser nicht vollständig zu entfernen.

Versuch 1. 4./11. Die zerriebenen Zotten werden theils mit 0,6%iger Chlornatriumlösung, theils mit Alkohol-Aether behandelt. Das Extract mit physiologischer Chlornatriumlösung enthält nach Coagulation der Eiweisskörper viel Glykogen, desgleichen die Auslaugung des Pulvers mit kaltem Wasser.

Ich kochte eine Probe des Filtrirpapiers ab und siehe da — ich bekam auf Jodzusatz eine schöne Blaufärbung. Ich vermochte aus 37,0 g Papier (etwa 2,5 Bogen) durch dreimaliges Auskochen und Fällen des eingeengten Filtrates mit viel Alkohol 0,034 g d. h. 0,092% reine Kyanogranulose darzustellen. Ich finde, dass schon Nasse (Zur Anat. und Physiol. der quergestreiften Muskelsubstanz, Leipzig 1882) und R. Külz (Zur quantitativen Bestimmung des Glykogens. Zeitschr. f. Biologie, Bd. 22) auf diese, die Resultate bei quantitativen Arbeiten wohl kaum beeinflussende Fehlerquelle hinweisen. Ich prüfte in dieser Hinsicht drei verschiedene Papiersorten: alle waren stärkehaltig.

2. Embryonale Muskeln.

Versuch 4. 4./11. Die Muskeln werden von einem 20 cm langen Rindsembryo abpräparirt und mit Glaspulver zerrieben. Theil *a* wird mit Alkohol und Aether, Theil *b* mit physiologischer Chlornatriumlösung behandelt. Der nach etwa 10 Stunden schwer filtrirbare, mit Chlornatriumlösrng hergestellte Auszug enthält nach Entfernung der Eiweisskörper kein Glykogen, aber viel Zucker. (Ich hatte das Becherglas über Nacht in einem geheizten Raume stehen lassen.) Das wässerige Extract des Theiles a enthält geringe Spuren von Glykogen, aber nicht soviel wie ein Decoct, das bis auf das Dreifache verdünnt werden kann, um noch dieselbe Reaction zu geben, wie jenes. Eine Auslaugung des Pulvers mit 5%iger Trichloressigsäure gibt ebenfalls nur schwache Glykogenreaction.

Versuch 5. 14./11. Von einem 21 cm langen Rindsembryo werden die Muskeln abpräparirt und ein Theil sogleich durch Abkochen auf Glykogen geprüft. Sie enthalten sehr viel Glykogen, keinen Zucker. Ein anderer Theil der zerriebenen Muskeln wird über Nacht mit Wasser ausgelaugt und das Extract am nächsten Morgen, wie gewöhnlich, auf Glykogen untersucht. Es enthält sehr geringe Spuren davon. Das durch Alkohol und Aether dargestellte Muskelpulver wird theils mit Wasser und mit Trichloressigsäure digerirt, theils abgekocht. Weder das Extract mit Wasser, noch das mit Trichloressigsäure noch das Decoct geben mit Jod Glykogenreaction. Bei Zusatz von absolutem Alkohol wird Anfangs keine Trübung des durch Abkochen des Pulvers erhaltenen Filtrates bemerkt. Erst nach Zusatz der dreifachen Alkoholmenge scheidet sich ein wolkiger Niederschlag ab, der durch Filtriren gesammelt wird. Derselbe löst sich mit sehr geringer Opalescenz in Wasser, färbt sich auf Jodzusatz nicht rothbraun, reducirt keine alkalische Kupfersulfatlösung und gibt weder Biuret- noch Xanthoproteïnsäurereaction. Nach längerem Kochen der fragl. Substanz mit verdünnter Salzsäure reducirt das dadurch entstandene Product deutlich frisch bereitete Fehling'sche Lösung. Ich halte diese Substanz für Achroodextrin, vermag mir aber keine Vermuthung darüber zu bilden, wie sie aus dem bei Prüfung des frischen Materials entschieden reichlich vorhandenen Glykogen mag entstanden sein, zumal in der Abkochung des Muskelpulvers keine Spur Zucker nachzuweisen war, was doch zu erwarten gewesen wäre, wenn das Achroodextrin fermentativen Processen seinen Ursprung verdankte.

Versuch 6. 7./12. Muskeln von einem 15 cm langen Rindsembryo werden wie oben theils zerrieben, theils durch Alkohol-Aether in ein Pulver verwandelt. Der frische Muskelbrei gibt sehr wenig Glykogen an kaltes Wasser und concentrirte Sodalösung, aus dem Pulver lässt sich zwar durch Kochen, nicht aber durch Auslaugen mit kaltem Wasser Glykogen extrahiren.

Versuch 7. 13./12. Rindsembryo von 26 cm Länge. Frisch auf Glykogen durch Auskochen geprüfte Muskeln enthalten solches. Zerriebene Muskeln geben an concentrirte Natriumcarbonatlösung ziemlich viel, an 0,5%ige Essigsäure sehr viel und an Wasser sehr wenig Glykogen. Das Muskelpulver gibt Glykogen an concentrirte Natriumcarbonatlösung 0,5%ige Essigsäure, 0,5%ige Trichloressigsäure und an kochendes Wasser, aber nur geringe Spuren an kaltes

Wasser. Wenn man das Pulver mit Trichloressigsäure erschöpft hat, so kann man durch Aufschliessen des Restes mit Natronlauge noch erhebliche Glykogenmengen daraus gewinnen.

Eine Probe des mit Wasser verriebenen Pulvers war 8 Tage lang im Freien, in einer Kältemischung stehend, vergessen worden. Nach Ablauf dieser Frist liess sich nach langsamem Aufthauen reichlich Glykogen in der über dem Bodensatze befindlichen opalescenten Flüssigkeit nachweisen.

3. Embryonale Lunge.

Versuch 8. 14./11. Rindsembryo von 21 cm Länge. Die frische Lunge gibt an kochendes Wasser viel Glykogen ab, an kaltes dagegen bedeutend weniger. Durch 5%ige Trichloressigsäure wird reichlich Glykogen extrahirt. Das durch Alkohol-Aether dargestellte Pulver der Lunge lässt Glykogen in Lösung gehen, wenn es mit 5%iger Trichloressigsäure, 0,5%iger Essigsäure, kochendem und kaltem Wasser extrahirt wird. Wenn das Pulver so lange mit stets erneutem Wasser gekocht wird, bis im Filtrat kein Glykogen mehr nachzuweisen ist, so lässt sich durch Trypsinverdauung im Rückstande nochmals Glykogen nachweisen.

Versuch 9. 13./12. Lunge von einem Rindsembryo gibt an concentrirte Sodalösung und an 0,5%ige Essigsäure viel, an kaltes Wasser weniger Glykogen. Das durch Alkohol dargestellte Pulver gibt schon an kaltes Wasser sehr viel Glykogen ab; desgleichen an Trichloressigsäure. Aus dem mit kaltem Wasser erschöpften Lungenpulver lässt sich auch mit 5%iger Trichloressigsäure keine Spur Glykogen extrahiren. Der Uebersicht halber sind die Resultate obiger 9 Versuche in folgender Tabelle neben einander gestellt.

Tabelle 2.

No. des Versuches	Gewebeart	Es löst sich Glykogen in				
		0,6% NaCl oder H_2O (kalt)	H_2O (koch.)	5% CCl_3COOH	½% CH_3COOH	concent. Na_2CO_3
I	Chorionzotten, frisch . .	viel				
I	„ m. Alkoh. behand.	„				
II	„ frisch	„		viel	viel	viel
II	„ m. Alkoh. behand.	„				
III	„ frisch	„			„	„
III	„ m. Alkoh. behand.	„				
IV	Muskeln, frisch	nichts, aber Zucker				
IV	„ m. Alkoh. behand.	Spuren	etwas	Spuren		
V	„ frisch	„	viel			
V	„ m. Alkoh. behaud.	nichts	nichts	nichts	aber	Dextr.
VI	„ frisch	Spuren				etwas
VI	„ m. Alkoh. behand.	nichts	etwas			
VII	„ frisch	Spuren			viel	viel
VII	„ m. Alkoh. behand.	„	viel	viel	etwas	„
VIII	Lunge, frisch	etwas	„	„		
VIII	„ m. Alkoh. behand.	„		etwas	„	
IX	„ frisch	„			viel	viel
IX	„ m. Alkoh. behand.	viel	viel	viel		

Um auch einen Beleg zu haben, welcher die Mengenverhältnisse der durch Wasser und Trichloressigsäure zu extrahirenden Glykogenmengen illustrirte, machte ich folgenden Versuch.

Versuch 10. 2./2. Ein Rindsembryo von 17 cm Länge und 211 g Gewicht wird fein zerhackt und in zwei Portionen getheilt. Die eine (*a*) wiegt 104,5 g, die andere (*b*) 107,5 g. Theil *a* wird mit Glaspulver fein zerrieben und darauf mit kaltem Wasser so lange extrahirt, als noch Glykogen in der Flüssigkeit nachzuweisen ist. Dazu ist zwölfmaliger Wasserwechsel erforderlich. Die vereinigten Filtrate (sehr langsam und nur unter Anwendung negativen Drucks zu filtriren) werden schwach angesäuert und gekocht. Das Decoct wird von 1500 cm³ bis auf 100 cm³ eingeengt und nach dem Erkalten mit 5 g Trichloressigsäure in Substanz versetzt. Nach abermaliger Filtration wird durch Zusatz von 2 Vol. absoluten Alkohols ein rein weisser Niederschlag erhalten, der gewaschen und getrocknet wird.

Der mit Wasser ausgelaugte Brei wird jetzt mit 5%iger Trichloressigsäure extrahirt. Es geht nur sehr wenig Glykogen in Lösung. Das fast gar nicht opalisirende Filtrat wird, ohne vorher eingeengt zu werden, ebenfalls mit 2 Vol. absoluten Alkohols gefällt. Der Rest des Fleischbreies, der also an Trichloressigsäure kein Glykogen mehr abgab, wird nunmehr mit Natronlauge aufgeschlossen, neutralisirt und nach Entfernung der Eiweisskörper vermittelst Salzsäure und Jodquecksilberkalium durch Alkohol gefällt.

Portion *b* wird mit Zusatz von 2 ccm Natronlauge zerkocht und nach Brücke weiter auf Glykogen verarbeitet. Das Resultat zeigt folgende Tabelle.

Tabelle 3.

Extractionsmittel	Portion *a* 104,5 g: Reines Glykogen g	Reines Glykogen %	In Abzug gebrachte Asche	Gesammtprocent	Portion *b* 107,5 g dch. NaOH aufgeschloss.: Gefunden. Glykogen	Abzug an Asche	Gesammtproc.
Kaltes Wasser . . .	0,8265	0,79	0,006		1,2120	?	1,13
5% Trichloressigsäure	0,0927	0,088	0,0	1,043	—	—	—
Zerkochen mit NaOH	0,1710	0,163	0,001		—	—	—

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, dass Chorionzotten und embryonale Lunge stets, gleichgültig ob zuvor mit Alkohol behandelt oder nicht, beträchtliche Glykogenmengen an kaltes Wasser abgeben. Anders verhalten sich aber embryonale Muskeln. Fünfmal finden wir nur Spuren an kaltes Wasser abgegeben, zweimal sogar überhaupt nichts (IV ist natürlich nicht zu rechnen, da die Abwesenheit von Glykogen auf Umwandlung in Zucker beruhen kann). Alle anderen daraufhin geprüften Extractionsmittel gaben jedoch ausser Versuch V, wo sich Dextrin findet, ein positives

Resultat. Man könnte geneigt sein, dieses abweichende Verhalten der embryonalen Muskeln dem histologischen Bau derselben zuzuschreiben. Denn wie wir aus dem vorigen Kapitel wissen, liegt die grössere Menge des Glykogen im Innern der Muskelfasern, also allseits von Eiweisssubstanzen und dem um die Periode, aus der die untersuchten Stücke stammen, sich bereits bildenden Sarkolemm umschlossen.

Bei der Lunge dagegen und bei den Chorionzotten befindet sich das in relativ viel grösseren Mengen vorhandene Glykogen in Zellen, die nur äusserst geringe Mengen von Protoplasma besitzen und noch dazu, wie das ganz physiologisch zu sein scheint, abgestossen werden, zerfallen und so das Glykogen frei geben.

Allein, wenn man erwägt, dass beim Zerreiben der Muskeln mit Glaspulver die einzelne Muskelfaser doch jedenfalls vielfach mechanischen Insulten ausgesetzt wird, die genügende Risse und Lücken schaffen müssen, aus denen das Glykogen austreten kann, so will die obige Erklärung nicht recht befriedigen. Die histologischen Verhältnisse mögen zwar mitwirken, doch ist in ihnen allein jedenfalls die Ursache der Schwerlöslichkeit des Glykogens der Muskeln im Wasser nicht zu suchen. Am Ende dieses Abschnittes will ich versuchen, eine Erklärung zu geben, welche mehr Wahrscheinlichkeit für sich hat.

B. Leber erwachsener Thiere.

Versuch 1. 27./10. Die Leber eines 2 Tage lang mit gekochtem Reis gefütterten Kaninchens wird mit der Scheere verkleinert und mit Sand fein zerrieben. Sie gibt viel Glykogen an kaltes Wasser, $^1/_2$%ige Essigsäure, 5%ige Trichloressigsäure, 2%ige Metaphosphorsäure, concentrirte Sodalösung und an kochendes Wasser. Das mit Alkohol dargestellte Leberpulver gibt reichlich Glykogen an kaltes Wasser, kochendes Wasser und Trichloressigsäure.

Versuch 2. 31./10. Der in gleicher Weise ausgeführte Versuch ergibt ähnliche Resultate (vergl. Tab. 4).

Während Fränkel bei diesen beiden Versuchen den Einwurf erheben kann, die Thiere, denen die Lebern entnommen wurden, seien mit Kohlenhydraten überfüttert, ist eine solche Einwendung bei folgendem Versuch nicht gerechtfertigt, da das Thier nach einem längeren Marsche innerhalb des letzten Tages nur ein kleines Bündel Heu zu fressen bekommen hatte.

Versuch 3. 10./12. Leber von einem Schaf. Dieselbe wird sofort nach Tödtung des Thieres ins Laboratorium gebracht und etwa 30 Minuten post mortem auf folgende Weise verarbeitet. Die gesammte Leber wird zu einem

feinen Brei zerhackt und zerrieben, um sodann in mehrere Theile getheilt zu werden. Ein Theil (*a*) kommt zur Extraction in kaltes Wasser und wird mit letzterem öfters in einer Reibschale zerrieben. Ein anderer Theil (*b*) wird in einem Becherglase einer Temperatur von etwa — 12° ausgesetzt. Eine dritte Portion (*c*) wird mit ½%iger Essigsäure von Zimmertemperatur, eine vierte (*d*) mit ½%iger Essigsäure bei einer Temperatur von — 12°, eine fünfte (*e*) mit concentrirter Natriumcarbonatlösung ausgelaugt.

Nach etwa 12 Stunden werden die gefrorenen Portionen *b* und *d* in einer Reibschale zerstossen und durch auf den Brei gegossenes, 30° warmes Wasser rasch aufgethaut, um, wie auch die anderen Portionen, filtrirt zu werden. Dabei stellt sich heraus, dass Theil *b* entweder trüb oder, wenn wieder von Neuem aufs Filter gebracht, gar nicht filtrirt. Deswegen werden zu dem Brei 2 Vol. absoluten Alkohols zugesetzt und die gelbliche Flüssigkeit von dem entstandenen Bodensatz abfiltrirt. Letzterer wird mit kaltem Wasser zerrieben, worauf die Flüssigkeit völlig klar von den coagulirten Eiweisskörpern abfiltrirt. Auch die mit concentrirter Sodalösung ausgelaugten Proben filtriren gewöhnlich äusserst langsam, weshalb ich dieselben vor dem Filtriren in der Regel mit Essigsäure bis zur ganz schwachen Alcalescenz zu neutralisiren pflegte, wodurch das Filtriren bedeutend erleichtert wird. Nach der weiteren üblichen Verarbeitung zeigt sich, dass Portion *b*, *d* und *e* viel Glykogen, Portion *c* etwas weniger und *a* deutlich nachweisbare Mengen enthält.

Der Rest des Leberbreies wird nach der gewohnten Methode mit Alkohol und Aether zu einem feinen Pulver verarbeitet. Aus demselben ist durch kaltes Wasser gar kein, durch ½% Essigsäure sehr wenig, durch Trichloressigsäure und concentrirte Sodalösung ziemlich viel Glykogen zu extrahiren. Da die durch Extraction mit kaltem Wasser gewonnene Flüssigkeit stark reducirt, so ist es nicht unwahrscheinlich, dass etwa gelöstes Glykogen saccharificirt war, zumal in Essigsäure und Sodalösung Glykogen ausgezogen worden ist. Das mit kaltem Wasser behandelte Pulver enthält nach Aufschliessen mit Natronlauge noch viel Glykogen und gibt ebenfalls Glykogen an 5%ige Trichloressigsäure.

Versuch 4. 9./1. Schafleber von einem Gewicht von 855 g. Die Leber wird fein zerhackt und in vier Theile getheilt. Theil *a* wird zur quantitativen Bestimmung des Glykogens reservirt, *b* wird ohne weiteren Zusatz in eine Kältemischung gestellt, *c* wird mit etwa 200 ccm Wasser verrieben und der Einwirkung der Kältemischung überlassen, Portion *d* endlich wird mit Alkohol zu Pulver verarbeitet.

Bei der quantitativen Bestimmung des Glykogens in Theil *a* verfuhr ich so, dass ich den Brei mit 5%iger Trichloressigsäure gründlich zerrieb, das Gemisch unter öfterem Umrühren etwa 1 Stunde sich selbst überliess und dann durch Colirtuch scharf abpresste. Von dem Tuche wurde der Pressrückstand sorgfältig abgeschabt, das Tuch in Trichloressigsäure ausgewaschen und diese Säure zu abermaliger Extraction des Breies benutzt. Der Process wird dreimal wiederholt. Die vereinigten Filtrate werden sodann ohne vorheriges Einengen mit Alkohol gefällt, und der abfiltrirte, rein weisse Niederschlag mit Alkohol gewaschen. Der letzte Pressrückstand wird darauf mit

Zusatz von Natronlauge zerkocht und für sich allein nach der Brücke'schen Methode weiter behandelt.

Die an Trichloressigsäure abgebene Menge betrug 5,9765 g, die im Pressrückstande noch gefundene 1,2080 g. Die erste Quantität war völlig, die zweite fast völlig aschefrei; die erste enthielt nach der Probe von Lassaigne keinen Stickstoff, die zweite deutliche Spuren.

Portion *b* wird, nachdem der Brei einige Stunden gefroren war, zerstossen und mit der Presse durch Colirtuch scharf abgepresst. Da der trübe, auf diese Weise gewonnene Saft entweder trüb oder gar nicht filtrirt, so wird er mit Eiswasser verdünnt und mit der Centrifuge während $^3/_4$ Stunden centrifugirt. Nach dieser Procedur ging die Filtration sehr gut von Statten und lieferte ein von Zellen oder Zellfragmenten freies Filtrat. Dasselbe wurde mit Trichloressigsäure in Substanz bis zu etwa 5 % versetzt und nach abermaliger, öfters wiederholter Filtration durch Alkohol gefällt. Es ergaben sich 0,5010 g eines rein weissen, asche-, aber nicht stickstofffreien Glykogens.

Der Pressrückstand und der durch Centrifugiren erhaltene Bodensatz werden mit Wasser bis zur Consistenz eines flüssigen Breies zerrieben und abermals einige Stunden in eine frische Kältemischung zurückgebracht, um dann weiter in der soeben beschriebenen Weise behandelt zu werden. Es liessen sich nochmals 3,4570 g Glykogen daraus darstellen.

Portion *c* lieferte, ebenso behandelt, aber nur einmal abgepresst, 2,2015 g aschefreies, aber schwach mit stickstoffhaltigen Substanzen verunreinigtes Glykogen.

Das vermittelst Alkohol hergestellte Leberpulver gab Glykogen an Glycerin, Trichloressigsäure, concentrirte Sodalösung und an Wasser. Während aber bei Zimmertemperatur nur geringe Spuren von Glykogen in Lösung gingen resp. in der Lösung nachgewiesen werden konnten, erhielt ich bei Anwendung niederer Temperaturen sehr viel Glykogen durch Extraction mit Wasser, wie gleich gezeigt werden soll. Als ich das Pulver, welches mit Wasser zu einem Brei verrieben und so der Einwirkung der Kältemischung ausgesetzt gewesen war, in der Reibschale zerstossen und aufgethaut hatte, wurde die Flüssigkeit möglichst rasch, um etwaige Saccharificirung zu verhindern, filtrirt. Das klar und rasch ablaufende Filtrat enthielt fast kein Eiweiss und gab keine deutliche Glykogenreaction. Ich brachte den Rückstand, mit Wasser versetzt, abermals in die Kältemischung zurück und verfuhr, nachdem derselbe wieder gefroren war, genau so wie das erste Mal und war sehr erstaunt, dieses Mal ein stark opalescirendes, eiweisshaltiges und sehr glykogenreiches Filtrat zu bekommen. Ich erhielt 2,2410 g etwas asche- und stickstoffhaltiges Glykogen. Da ich das Gewicht des Pulvers, welches ausserdem noch Sand enthielt, nicht bestimmt hatte, so vermag ich nicht genau anzugeben, wie viel Procent des überhaupt in der verarbeiteten Menge enthaltenen Glykogens die 2,2410 g ausmachen. Um es annähernd zu bestimmen, zerkochte ich den Rest des Pulvers mit Natronlauge und verarbeitete ihn weiter nach Brücke. Er enthielt noch 0,5340 g Glykogen. Bei Weitem die grösste Menge war also durch Wasser gelöst.

Auffallend ist der Umstand, dass ich beim erstmaligen Aufthauen und raschen Filtriren kein Glykogen in Lösung bekam, was ich mir so erkläre,

dass durch das Gefrieren die Zellen zwar gesprengt waren, aber dem Glykogen durch das sofort nach dem Aufthauen erfolgende Filtriren keine Zeit gelassen war, sich in dem eiskalten Wasser zu lösen.

Versuch 5. 16./1. Leber eines durch Kopfabschneiden getödteten Kaninchens. Die Leber wird von der Vena portarum aus mit einer unter 0° abgekühlten, physiolog. Kochsalzlösung (1%ige Chlornatriumlösung mit dem gleichen Gewicht Schnee gemischt) ausgespült. Ein Stückchen derselben (14,5 g) wird zur quantitativen Glykogenbestimmung abgeschnitten und, wie im vorigen Falle verrabeitet. Es finden sich darin 0,5195 g oder 3,58% stickstoff- und aschefreies Glykogen.

Der übrige Theil der Leber (35,5 g) wird in einem Becherglase in einer Kältemischung von gleichen Theilen Schnee und Ammoniumsulphat gefrieren gelassen, um sodann im hartgefrorenen Zustande in dünne Scheibchen zerhobelt zu werden. Diese werden durch Zerreiben in einer abgekühlten Reibschale zu einem feinen Schnee verarbeitet. Der letztere wird mit dem dreifachen Vol. physiolog. Kochsalzlösung in einem hohen engen Glascylinder zu Sedimentiren in einen etwa 5—7° C. warmen Raum gebracht. Im Verlauf von 3 Stunden stieg die Temperatur von — 3° auf — ½° und wurde auf dieser Höhe durch Hineinstellen in einen weiteren, mit Eiswasser gefüllten Cylinder so lange gehalten, bis die über dem Sediment stehende schwach röthliche, etwas getrübte Schicht beim wiederholten Untersuchen von Proben, die mit der Pipette herausgehoben waren, keinerlei zellige Elemente mehr enthielt. Es dauerte dies 34 Stunden. Die vorsichtig abgeheberte Flüssigkeit wird darauf filtrirt, während durch auf das Filter gelegte Eisstückchen die Temperatur stets auf 0° erhalten wird. Das Filtrat ist röthlich opalescent, aber völlig frei von Zellen. Nur Fetttröpfchen und feine Granula können in demselben gefunden werden. Nachdem ich mich von der Abwesenheit ganzer Zellen überzeugt hatte, liess ich das Filtrat, um etwaigen Fermentwirkungen zuvor zu kommen, direkt vom Filter in 10%ige Trichloressigsäure tropfen, wobei sich ein reichliches Coagulum ausschied. Dieses Leberextract enthielt 0,538 g ziemlich reines Glykogen Der zur Fällung benutzte Alkohol wurde verdunstet. Der Rückstand desselben reducirte, in Wasser gelöst, selbst nach energischem Kochen keine frische Fehling'sche Lösung.

Da das Sediment, von dem das Extract abgehebert war, jedenfalls noch reiche Mengen Glykogen enthalten musste, so wurde es derselben Behandlung nochmals unterworfen mit der Abänderung, dass das Sediment dieses Mal gleich nach dem Aufthauen abgepresst und die Pressflüssigkeit für sich allein zum Sedimentiren hingestellt wurde. Dieses Mal dauerte das Sedimentiren 3 Tage. Ich erhielt nochmals 0,6150 g Glykogen, das aber nicht rein weiss, sondern grau aussah und Krusten bildete. Im Ganzen hatte ich also 1,1350 g oder 3,25% nicht ganz reines Glykogen auf kaltem Wege allein durch Wasser erhalten, während nur 3,58% daraus überhaupt hatten gewonnen werden können.

Da aber das Glykogen nicht rein war, so löste ich es abermals durch Auskochen der beiden Filter, setzte etwas Jodquecksilberkalium und Salzsäure zu und fällte nach wiederholtem Filtriren mit Alkohol. Das jetzt

erhaltene lockere weisse Pulver war stickstofffrei, wog 1,008 g und enthielt 0,0045 g Asche.

Als ich versuchte, dieses Verfahren auch für den Kaninchenmuskel anzuwenden, war es mir nicht möglich, aus 35,5 g Adductorenmuskel der Hinterschenkel wägbare Mengen Glykogen darzustellen. Die Ergebnisse der letzten Versuchsreihe sind in folgende Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 4.

No. des Versuches	Bezeichnung des extrahirten Gewebes	Es löst sich Glykogen in					
		Wasser	H_2O beim Gefrieren	CCl_3-COOH	CH_3-COOH	Na_2CO_3	Bemerkungen
I	Kaninchenleber, frisch .	viel		viel	viel	viel	m. Reis gefütt.
I	„ m. Alkoh. behand.	„		„			„
II	„ frisch	etwas		„			„
II	„ m. Alkoh. behand.	nichts, ab. Zucker		„		etwas	„
III	Schafleber, frisch . . .	etwas	viel		etwas	viel	nicht überfütt.
III	„ m. Alkoh. behand.	nichts, ab. Zucker		„	wenig	etwas	„
IV	„ frisch		1,60 resp. 1,36%	2,35%			die Leber enthält überh. 2,833%
IV	„ m. Alkoh. behand.	etwas	80,8% der im Pulver vorhanden. Menge	viel		etwas	
V	Kaninchenleber, frisch .		2,84%				die Leber enthält 3,58%

Die Versuche haben zur Genüge bewiesen, dass sich allein durch kaltes Wasser fast alles (etwa 80% der Gesammtmenge) Glykogen aus der Leber extrahiren lässt, wenn man nur Sorge dafür trägt, dem indiffusiblen Glykogen dadurch die Möglichkeit zur Lösung zu bieten, dass man die es normaler Weise umhüllende Plasmaschicht durch Zerfrieren sprengt. Selbst wenn die Eiweisskörper der Leberzellen vorher durch Alkohol coagulirt sind, erhält man ähnliche Resultate.

Es mögen jetzt zum Schlusse noch einige Versuche angeführt sein, die den Zweck haben, die Extrahirbarkeit des Glykogens aus dem künstlich dargestellten Glykogeneiweissgemisch zu erläutern.

Aehnliche Versuche wurden schon von R. Külz[1]) ausgeführt. Derselbe erhitzte ein Gemisch von Eierklar und Glykogen mit Zu-

1) R. Külz, Zur quantitativen Bestimmung des Glykogens. Diese Zeitschrift Bd. 22.

satz von Kalilauge und fällte sodann die Eiweisskörper nach Neutralisation mit Salzsäure und Jodquecksilberkalium. Er konnte stets einen Verlust von 8—13 % an Glykogen konstatiren. Um wie viel mehr muss man einen solchen erwarten, wenn das Glykogen erst mit Alkohol gefällt und mit coagulirtem Eiweiss eingehüllt wird, um dann nach dem Trocknen nur mit Wasser behandelt zu werden! Dass aber dennoch ein solches Gemisch keineswegs das Glykogen so innig festhält, wie Fränkel angibt, mögen folgende Versuche beweisen.

Versuch 1. 29./11. Hühnereiweiss wurde geschlagen und filtrirt. 25 ccm des filtrirten Eiweisses wurden in einer Lösung von 1,0 g völlig reinen Glykogens gemischt und dann durch das dreifache Vol. absoluten Alkohols coagulirt. Nachdem der Alkohol nach etwa 1/4 stündiger Einwirkung abgesogen war, wurde das Coagulum durch Pressen zwischen Fliesspapier vom Alkohol oberflächlich befreit und bei Zimmertemperatur getrocknet, um sodann mit Wasser gründlich zerrieben zu werden. Das von diesem Brei gewonnene Filtrat opalescirte stark und enthielt neben viel Glykogen auch noch Eiweiss. Der auf dem Filter gebliebene Rückstand wurde etwa 1 1/2 Tage lang mit Wasser ausgewaschen und während dieser Zeit des öfteren mit Wasser in einer Reibschale zerrieben, um darauf mit Wasser gekocht zu werden. Im Decoct befand sich kein Glykogen. Um zu entscheiden, ob das Coagulum überhaupt noch Glykogen enthielt, wurde es mit ausgedautem Pancreasextract auf 18 Stunden in den Thermostaten gebracht. Das angesäuerte und filtrirte Verdauungsgemisch gab keine Glykogenreaction. Ich durfte also annehmen, dass alles Glykogen aus dem Gemenge allein durch kaltes Wasser extrahirt sei.[1])

Versuch 2, 3 und 4 ergaben fast das gleiche Resultat wie der vorige Versuch.

Versuch 5. 16./12. 1,0 g reines stickstofffreies Glykogen wurde mit 63,2 g Eiweiss in der bekannten Weise zu einem Coagulum verarbeitet, das nach Auswaschen mit Aether zuerst im Exsiccator über Schwefelsäure und dann bei 70° im Luftbade getrocknet wurde. Das zerriebene Pulver wog 9,3445 g. Es standen also dem 1,0 g Glykogen 8,3445 g Eiweiss zur Verfügung, mithin bedeutend mehr, als Fränkel für einen solchen Versuch fordert, da 25 ccm Eiweiss nur etwa 3,5 g Trockensubstanz enthalten.

Dieses Präparat gab mit Glaspulver zerrieben deutliche Spuren von Glykogen an kaltes, ziemliche Mengen an kochendes Wasser ab. An Trichloressigsäure wurde fast nicht mehr als an kaltes Wasser abgegeben.

2,4877 g des Präparates wurden mit Wasser unter Zusatz von Glaspulver zerrieben und die Flüssigkeit nach 1 Stunde abfiltrirt. Der Filterrückstand wurde abermals verrieben und sammt der Reibschale in eine Kältemischung

1) Ich finde im Protokoll nicht angegeben, ob Zucker im Verdauungsfiltrat nachzuweisen war. Jedenfalls wurde an dem gut tymolisirten Gemisch kein Fäulnissgeruch wahrgenommen.

zum Gefrieren gebracht, um sodann nochmals zerstossen und nach dem Aufthauen filtrirt zu werden. Der Process wurde zweimal wiederholt. Die vereinigten Filtrate wurden nach dem Einengen mit Trichloressigsäure in Substanz versetzt und durch öfters wiederholtes Filtriren vom Eiweissniederschlage getrennt .Auf diese Weise erhielt ich 0,1045 g etwas stickstoffhaltiges Glykogen mit einem Aschegehalt von 0,009 g. Durch langes, energisches Kochen des erschöpften Rückstandes mit Wasser gewann ich abermals 0,087 g Glykogen, das Spuren von Stickstoff und 0,008 g Asche enthielt. Der letzte Rest wurde zur Gewinnung noch etwa darin vorhandenen Glykogens mit Natronlauge zerkocht. Diese Bestimmung verunglückte leider.

Zu den nun folgenden Versuchen nahm ich nicht rohes Hühnereiweiss, sondern ein auf gleich zu beschreibende Weise von Salzen und fremdartigen Beimengungen gereinigtes Eieralbumin.

Das Weisse von 10 Eiern (etwa 300 ccm) wurde mit Essigsäure neutralisirt, unter Zusatz des gleichen Vol. Wassers geschlagen und zur Entfernung der Globuline filtrirt. Das Filtrat wurde durch die doppelte Menge einer Lösung von Ammoniumsulfat gefällt und die Flüssigkeit gründlich von dem massigen Niederschlage abgesogen. Der letztere wurde sodann zwischen Filtrirpapier gepresst, in etwas Wasser zerrieben und so lange in einem Pergamentschlauch gegen fliessendes Wasser dialysirt, bis eine durch Kochen in angesäuerter Lösung von Eiweiss befreite Probe durch Chlorbaryum nicht mehr getrübt wurde. Die jetzt erhaltene leicht bewegliche Eiweisslösung war völlig frei von Zucker und hatte eine schwach röthliche Farbe.

Versuch 6. 13./1. 50 ccm dieses Eiweisses wurden mit 50 ccm einer 2%igen Lösung asche- und stickstofffreien Glykogens vermischt und das Gemisch nach einigen Minuten unter Umrühren durch 2 Vol. absoluten Alkohol coagulirt. Nachdem letzterer nach zweistündiger Einwirkung erst durch neuen absoluten Alkohol und später durch Aether ersetzt war, wurde das Coagulum bis zur Gewichtsconstanz im Exsiccator und im Luftbade getrocknet. Ich erhielt 4,350 g eines feinen, sehr hartkörnigen Pulvers.

3,0775 g desselben, entsprechend 0,7078 g reinen Glykogens, wurden, wie oben, mit Wasser extrahirt und gaben 0,2010 g nicht völlig asche- und stickstofffreies Glykogen. Der ausgelaugte Rest wurde sodann mit kleinen Mengen Trichloressigsäure oft angerieben. Die so erhaltenen Filtrate waren völlig klar, ohne Opalescenz und gaben nur geringe Jodreaction. Sie enthielten noch 0,0045 g Glykogen, das nur auf Stickstoff untersucht werden konnte und sich frei davon erwies.

Der letzte mit Natronlauge aufgeschlossene Rest ergab nach dem Brückeschen Verfahren nochmals 0,0215 g Glykogen. Von den in der verarbeiteten Menge enthaltenen 0,7078 g Glykogen waren also nur etwa 32% wiedererhalten. Dieses Resultat contrastirt sehr mit dem im vorigen Versuch erhaltenen, da dort allein durch kaltes und kochendes Wasser 65,58% der Gesammtmenge extrahirt wurde.

Versuch 7. 13./1. Es wurde genau wie im vorigen Versuche ein Glykogeneiweissgemisch hergestellt, doch mit der Abänderung, dass vor dem Coaguliren mit Alkohol ein staubfein zerriebenes Glaspulver in dem Gemisch suspendirt wurde. Ich verfolgte dabei die Absicht, beim nachfolgenden Zer-

reiben mit Wasser eine gründlichere Zerkleinerung des Pulvers und somit eine grössere Ausbeute an Glykogen zu bewirken.

Das trockene Pulver wog 8,2275 g und enthielt 0,5 g aschefreies Glykogen. Aus 4,646 g dieses Pulvers erhielt ich durch Extraction mit kaltem Wasser 0,058 g, durch Erschöpfen des Rückstandes mit 5%iger Trichloressigsäure weitere 0,016 g und durch Zerkochen mit Natronlauge nochmals 0,0145 g Glykogen. Die Gesammtmenge des wiedergefundenen Glykogens betrug somit 0,0885 g oder 31,38% der gesammten im Gemisch vorhandenen Menge.

Versuch 8. 13./1. 25 ccm 2%iger Glykogenlösung werden mit 25 ccm einer möglichst concentrirten Lösung von Serumalbumin zusammengemischt und wie gewöhnlich weiter behandelt. Nach dem Trocknen wog das Coagulum 1,8110 g.

1,3595 g desselben (entsprechend 0,3753 Glykogen) gaben an kaltes Wasser 0,081 g, an Trichloressigsäure 0,028 g und durch Aufschliessen mit Natronlauge nochmals 0,005 g Glykogen. Im Ganzen wurden also erhalten 0,114 g oder 30,38% der in der angewendeten Substanz enthaltenen Menge.

Nachstehende Tabelle enthält dic Resultate dieser Versuche.

Tabelle 5.

No. des Versuches	Art und Menge der angewendeten Substanz	Darin enthaltenes reines Glykogen berechnet	Es wird Glykogen extrahirt durch: kaltes Wasser		5% CCl_3-COOH		Aufschliessen mit NaOH		Bemerkungen
			g	%	g	%	g	%	
I	Glykogeneiweiss	?	sehr viel	vielleicht 100%	—	—	—	—	Nicht mit Aether behandelt, nicht i. Exsiccator
II	„	?	viel, sehr wenig	?	—	—	—	—	nach ungenügender Alkoholwirkung: viel, spät. sehr wenig
III	„	?	sehr viel	?	—	—	—	—	mit Aether behandelt, aber nicht im Exsiccator getrocknet
IV	„	?	viel	?	—	—	—	—	mit Aether behandelt und im Exsiccator getrocknet
V	Glykogeneiweiss 2,4877 g	0,2662 g	0,1045	35,88	—	—	—	—	„
VI	Glyk. + Eieralbum. 3,0775 g	0,7078 g	0,2010	28,40	0,0045	0,63	0,0215	0,03	„
VII	Glykogen + Eieralbum. + Glaspulv. 4,646 g	0,2820 g	0,0580	20,57	0,0160	5,69	0,0145	5,14	„
VIII	Glykog. + Serumalbumin 1,3595 g	0,3753 g	0,0810	21,58	0,0280	7,45	0,0050	1,33	„

Die Resultate obiger 3 Versuchsreihen berechtigten mich zu dem Ausspruche, dass jene Behauptungen Fränkel's:

1. das frische Lebergewebe gebe an kaltes Wasser kein Glykogen ab, und
2. aus einem durch Vermischen von Glykogen und Eiweiss und Coagulation des Gemisches vermittelst Alkohols hergestellten Glykogeneiweiss sei Glykogen weder durch Säuren, noch Salze der schweren Metalle zu erhalten, sondern nur durch längeres Kochen mit oder ohne Zusatz von Kali

keineswegs jene allgemeine Gültigkeit beanspruchen dürfen, die ihnen von Fränkel beigelegt wird.

Freilich muss ich Fränkel darin unbedingt beipflichten, dass es viel leichter ist, durch eiweisscoagulirende Flüssigkeiten, welche zugleich Lösungsmittel des Glykogens sind, das letztere aus frischem Materiale zu extrahiren, als durch Wasser. Dieser Umstand wird aber meines Erachtens, um das noch einmal zu wiederholen, durch die Eigenschaft des Glykogens, nicht oder fast nicht durch Membranen oder den Membranen gleichwerthige Umhüllungen zu diffundiren, sowie durch den Umstand, dass es mechanisch von der unlöslichen Trägersubstanz absorbirt wird, zur Genüge erklärt.

Einen principiellen Unterschied zwischen dem künstlich dargestellten Glykogeneiweiss und den glykogenhaltigen Organen, den Fränkel so sehr betont, vermag ich aus den Ergebnissen meiner Versuche nicht herauszufinden. Zwar konnte ich verschiedentlich aus dem Eiweissglykogengemisch durch Trichloressigsäure nicht mehr Glykogen als durch Wasser extrahiren, doch treffen wir ja ein ähnliches Verhalten auch bei den durch Alkohol und Aether dargestellten Pulvern der Organe, in welchen die Eiweisssubstanzen bereits coagulirt waren. Auch diese gaben in vielen Fällen an Trichloressigsäure nicht mehr Glykogen ab, als an Wasser, während umgekehrt aus dem künstlichen Gemisch oft genug die Trichloressigsäure, was die Lösungsfähigkeit für Glykogen anbetrifft, sich dem Wasser überlegen zeigte. Es sind also die Resultate dort ebensowenig constant, wie hier.

Bei einer eingehenden Kritik der Resultate vorstehender Versuche müssen uns aber ausserdem mancherlei Einzelheiten auffallen.

Zunächst bedarf jenes abweichende Verhalten der embryonalen Muskeln, das auf Seite 465 und 466 schon erwähnt wurde, einer

Erklärung. Dass die histologische Structur allein es nicht sein kann, die das Glykogen am Gelöstwerden hindert, wurde dort bereits erörtert. Mehr Befriedigung habe ich in folgender Erklärung gefunden. In den Chorionzotten, sowie in der Lunge des Embryo ist das Glykogen ein Bestandtheil von vorübergehender Dauer. Schon Cl. Bernard[1]) zeigte, dass bereits längere Zeit vor der Geburt die Bronchialepithelien ihr Glykogen verlieren und die Plaques amniotiques unter gleichzeitiger Degeneration zu einer schmierigen, Calciumoxalat enthaltenden Masse glykogenfrei werden. Meine Untersuchungen (S. 451) zeigen, dass dieses Verschwinden des Glykogens nicht auf Resorption beruht, sondern auf einer Desquamation von glykogenhaltigen Zellen resp. einem Ausstossen des glykogenhaltigen Zellinhaltes. Die Eliminirung des Glykogens wird aber, wie das an vielen Präparaten direct zu sehen ist, von einer allmählich bis zum völligen Absterben der Zelle fortschreitenden Degeneration eingeleitet (Chorionzotten, Haut, Magen). Diese Beeinträchtigung der Vitalität wird höchst wahrscheinlich nicht ohne Rückwirkung auf die Trägersubstanz, welche das Glykogen absorbirt enthält, bleiben. Die Absorptionsfähigkeit der ersteren für das Glykogen wird verringert sein. Das Glykogen muss leichter gelöst werden können.

Anders bei den Muskeln, in welchen das Glykogen nicht eine ephemere Existenz führt, sondern während des ganzen Lebens einen wesentlichen, zur Function unentbehrlichen Bestandtheil ausmacht. In diesem Gewebe kann von einer Degeneration der Trägersubstanz und von einer Eliminirung des Glykogens, wie bei jenen Oberflächenorganen, wohl kaum die Rede sein.

Diese Reflection wird dem Leser etwas mehr an Wahrscheinlichkeit gewinnen, wenn ich ein Analogon anführe. Bekanntlich geben die rothen Blutkörperchen ihr Hämoglobin, sofern man nicht durch die bekannten, Lackfarbe herbeiführenden Einwirkungen das Gegentheil veranlasst, nie an das Serum oder an Kochsalzlösung ab, trotzdem doch beide Flüssigkeiten gute Lösungsmittel des Blutfarbstoffes darstellen. Sobald aber die Blutkörperchen durch Beeinträchtigung ihrer Lebensfähigkeit, etwa in Thromben oder in

1) Cl. Bernard, De la matière glycogène etc.

Extravasaten, aufhören normale, lebensfähige Blutkörperchen zu sein, lässt das nunmehr als abgeblasste Kugel noch lange erkennbare Stroma das Hämoglobin frei, welch' letzteres dann nach verschiedenen Umwandlungen die bekannten Hämatoïdinanhäufungen darstellt.

Ueberhaupt ist das Verhältniss zwischen Hämoglobin und Blutkörperchenstroma ein gutes Beispiel zur Charakteristik der Deductionen Fränkels. Mit dem gleichen Rechte, mit dem dieser die Präexistenz des Glykogens bestreitet, vermöchte ich zu behaupten, das Hämoglobin komme im Blute gar nicht präformirt vor, denn wir vermögen es ja nicht ohne Weiteres mit physiol. Kochsalzlösung zu extrahiren, obwohl es darin gut löslich ist. Erst nach Zusatz von Aether, gallensauren Salzen etc. lässt sich eine Lackfarbe erzielen.

Kommen wir nach dieser Abschweifung auf die Resultate obiger Versuche zurück, so muss in zweiter Linie überraschen, dass in Tabelle 5 von der durch Rechnung gefundenen Menge in Versuch VI, VII und VIII nur ein so geringer Procentsatz an Glykogen zurückerhalten wurde. Um dieses unerwartet grosse Deficit zu erklären, können mehrere Ursachen geltend gemacht werden.

Aus den Untersuchungen von R. Külz[1]) ist bekannt, dass beim Vermischen von Glykogen und Eiweiss selbst nach Zerkochen mit Kali bis zu 13% der angewandten Menge Glykogen nicht wieder zurückerhalten werden können. Dieses Deficit, so gross es auch scheinen mag, kann den enormen Verlust von fast 70% im vorliegenden Falle nur zum allergeringsten Theil erklären. Selbst wenn wir annehmen, dass bei unserem Glykogeneiweissgemisch relativ grössere Mengen Eiweiss auf weniger Glykogen angewendet wurden, als in den Versuchen von Külz, dass also von der Eiweissfällung mehr Glykogen mechanisch zurückgehalten wurde, als 9,47—13,56%, wie Külz angibt, und wenn auch bei den mannigfachen mit dem Glykogeneiweissgemisch vorgenommenen Manipulationen recht beträchtliche Mengen Glykogen trotz gründlichem Auswaschen aus den Filtern nicht wieder zu gewinnen waren, so muss dennoch ein Verlust von 70% räthselhaft erscheinen. Es

1) R. Külz, a. a. O.

gibt noch zwei Möglichkeiten, welche hierfür vielleicht verantwortlich gemacht werden könnten: die von vielen älteren und neueren Autoren beobachtete Saccharificirung des Glykogens durch Eiweisslösungen und eine event. gleiche oder ähnliche Wirkung der Trichloressigsäure, die ich zur Fällung der gelösten Eiweisskörper stets in Substanz zugesetzt hatte, um das Flüssigkeitsquantum nicht unnöthigerweise zu vermehren.

Zur Entscheidung der ersteren Frage durfte ich mich nicht auf die Angaben, welche sich in der Literatur finden, verlassen, denn alle erregen bei näherer Betrachtung den Verdacht, dass die Umwandlung des Glykogens resp. Amylums in Zucker weniger dem Contact mit Eiweiss als vielmehr der Einwirkung von Mikroorganismen zuzuschreiben ist. Insbesondere sind die älteren Untersuchungen von Cl. Bernard, dessen ausgewaschenes Fibrin erst zu saccharificiren begann, wenn die Sonne längere Zeit intensiv darauf geschienen hatte, ferner die von Bizio[1]) und von Lépine[2]) für die Entscheidung der vorliegenden Frage so gut wie werthlos. Auch die Angaben von v. Wittich, welcher Saccharificirung nach Contact mit Geweben fand, sowie diejenigen von Seegen und Kratschmer[3]) können hier nicht als bindend angesehen werden, denn obgleich die letzteren Autoren hervorheben, dass die Organe frisch getödteten Thieren entnommen waren, so kann man sich bei näherem Eingehen auf ihre Angaben des Gedankens nicht erwehren, dass in keinem ihrer Versuche die Fäulniss gänzlich ausgeschlossen war. Selbst die 1887 erschienene Arbeit Seegen's[4]) leidet an dem gleichen Fehler. Es war doch sehr verdächtig, dass die Saccharificirung des Glykogens besonders dann eintrat, wenn das Blut durch hindurchgesogene Luft arteriell erhalten und ihm dadurch Gelegenheit zur Fäulniss geboten wurde.

---

1) Bizio, Compt. rend. 65. 175.

2) Lépine, Entstehung und Verbreitung der thierischen Zuckerfermente. Berichte d. k. sächs. Gesellsch. d. Wiss. Oct. 1870.

3) Seegen und Kratschmer, Beiträge zur Kenntniss der saccharificirenden Fermente. Pflüger's Arch. 14.

4) Seegen, Ueber die Einwirkung von Muskel und Blut auf Glykogen. Centralblatt f. die med. Wiss. 1887.

Versuche, welche ich in dieser Richtung unter strengster Asepsis anstellte, deren Wiedergabe in extenso jedoch zu viel Platz beanspruchen würde, ergaben, dass selbst unter Ausschluss der Fäulniss durch Serumalbumin eine sehr deutliche, durch Hühneralbumin eine ganz unbedeutende Saccharificirung stattfindet. Entbluteter Muskel veranlasste ebenfalls eine recht deutliche Umwandlung des Glykogens in Zucker. Während es sich beim Muskel und beim Serumalbumin um Fermente handeln kann, die den Eiweisssubstanzen beigemengt waren, ist die Annahme eines solchen beim gereinigten Eieralbumin so ziemlich ausgeschlossen. Die Saccharificirung war indess eine so unbedeutende, dass sie jenes hohe Deficit im Versuch VI, VII und VIII der Tabelle 5 nur zum allergeringsten Theil zu erklären vermag. Ausserdem ist das Deficit beim Serumalbuminglykogen nicht viel grösser, als beim Eieralbuminglykogen, obwohl doch das Serumalbumin weit energischer saccharificirte.

Sehen wir nun, wie sich die Trichloressigsäure dem Glykogen gegenüber verhält.

Dass chemische Agentien auf das Glykogen auch schon bei niederer Temperatur verändernd einwirken, ist ja zur Genüge bekannt. Die Versuche von Dietl und Vintschgau[1]) ergaben, dass beim Erwärmen von Glykogen mit 0,04% iger Kalilauge eine Gewichtszunahme, beim Erhitzen über 100° aber eine Gewichtsabnahme des Glykogens stattfindet. Ausserdem weisen auch die physikalischen Veränderungen des Glykogens nach Zusatz von Säure oder Alkalien darauf hin, dass diese letzteren sich nicht völlig indifferent dem Glykogen gegenüber verhalten. Weitere Versuche in dieser Richtung, deren Mittheilung der mir zu Gebote stehende Raum nicht gestattet, haben ergeben, dass die Trichloressigsäure bei Temperatur unter 100° einen Glykogenschwund nicht veranlasst, dass sie aber sofort aufhört dem Glykogen gegenüber indifferent zu sein, sobald man die Glykogenlösung in Glasröhren eingeschmolzen auf oder über 100° erhitzt. Bei dieser Temperatur befand sich im Röhreninhalte ausser abgespaltenem Chloroform

1) Dietl u. Vintschgau, Ueber die Einwirkung warmer Kalilösungen auf Glykogen. Pflüger's Arch. 13.

stets reichlich Zucker. Controlversuche mit reinen Glykogenlösungen ohne Zusatz von Trichloressigsäure ergaben, dass bei 107° noch keine hydrolytische Spaltung auftrat, wohl aber bei 190° bei welcher Temperatur sämmtliches Glykogen in Zucker und zum Theil in Caramel umgewandelt vorgefunden wurde.

Da ich aber in den drei erwähnten Versuchen die mit Trichloressigsäure versetzten Extracte nie Temperaturen ausgesetzt hatte, welche dem Siedepunkte nahe war, und andererseits die Saccharificirung durch Eiweiss kaum in Anschlag gebracht zu werden braucht, so steht eine genügende Erklärung für den Glykogenverlust von 70% noch aus. Ich vermag sie nicht zu geben, und muss es weiteren Nachforschungen vorbehalten bleiben, die Ursache dieses auffallenden Deficits aufzufinden.

Im Anschluss an diese Versuche sei mir noch eine kurze Kritik der Methode Fränkels zur Darstellung des Glykogens gestattet. Ich bin in der Lage, die meisten Vorzüge, welche Fränkel seiner Methode zuschreibt, unbedingt bestätigen zu können, sobald es sich darum handelt, ein möglichst reines, asche- und stickstofffreies Präparat auf möglichst einfache Weise und auch mit nicht grossem Aufwande an Kosten darzustellen. Ich kenne keine Methode, welche rascher ein so tadelloses reines Präparat zu liefern im Stande wäre. Sobald man sie aber zur quantitativen Glykogenbestimmung anwenden will, lässt sie im Stich resp. ihre Nachtheile sind so gross, dass man zweckmässiger das erprobte Brücke'sche Verfahren beibehält. Wenn Fränkel schreibt, nach dem Abfiltriren des ersten Extractes sei in dem Rückstande nur noch so viel Glykogen vorhanden, wie die mechanisch zurückgehaltene Flüssigkeitsmenge zu lösen vermöge, so vermag ich die Behauptung nach meinen Erfahrungen nicht zu bestätigen. Fast alle früheren Untersucher auf diesem Gebiete (Salomon, Kratschmer, Seegen, Boehm) heben hervor, wie unendlich schwer es sei, sämmtliches Glykogen aus den Leberzellen oder Muskelfasern zu extrahiren; ja Boehm und Hoffmann[1]), denen doch in dieser Hinsicht gewiss eine reiche Erfahrung zur

1) Boehm, Ueber das Verhalten des Glykogens und der Milchsäure im Muskelfleisch mit besonderer Berücksichtigung der Todtenstarre. Pflüger's Archiv 23.

Seite steht, behaupten, dass es überhaupt nicht möglich sei, selbst nicht durch viele Male wiederholtes Kochen die Gesammtmenge des Glykogens zu gewinnen, dass sogar nach 12stündiger Extraction im Dampftopf noch 5% zurückblieben. Es wäre doch merkwürdig, wenn jetzt der Trichloressigsäure so grosse Vorzüge vor dem Auskochen innewohnen sollten. Eine Controle ergab denn auch das entgegengesetzte Resultat. Ich brauche nur auf Versuch IV auf Seite 467 und 468 hinzuweisen. Trotzdem hier der mit 5%iger Trichloressigsäure verriebene Brei dreimal mit der Presse scharf abgepresst war, so enthielt der Rückstand dennoch 1,2080 g Glykogen d. h. 19,5% der gesammten gefundenen Menge. Wie wäre es auch sonst zu erklären, dass nach Härtung von kleinen Leberstückchen in Trichloressigsäure selbt die Zellen der Randpartien oft noch genug mikroskopisch erkennbares Glykogen enthalten.

Wiederholt man nun die Extraction mit Trichloressigsäure, um den Fehler möglichst klein zu machen, sehr oft, so erhält man ein grosses Quantum Flüssigkeit, dessen Einengen wahrscheinlich nicht einwurfsfrei ist. Man ist also gezwungen, ohne einzuengen, mit sehr viel absolutem Alkohol zu fällen, was aber, wie leicht zu begreifen, ganz abgesehen von der Kostspieligkeit, viel Missstände und grosse Fehlerquellen mit sich bringt.

Nun könnte man ja mit Kali- oder Natronlauge aufschliessen, neutralisiren und mit Trichloressigsäure die noch gelösten Eiweisskörper fällen. Eine leider etwas spät gemachte Erfahrung hat mich indess gelehrt, wie wenig geeignet die Trichloressigsäure für diesen Zweck ist. So vorzügliche Dienste sie in den Fällen leistet, wo es sich darum handelt, die Eiweisskörper am Gelöstwerden zu hindern, ebenso leicht lässt sie im Stich, wenn man sie zur Fällung von schon gelösten Proteinsubstanzen anzuwenden versucht.

Man kann sich von diesem Verhalten, auf das, wie ich nach Abschluss meiner Versuche erfahren habe, auch Neumeister[1]) neuerdings aufmerksam macht, leicht überzeugen, wenn man ein Stück eines Muskels mit Kali zerkocht, neutralisirt, Trichloressigsäure zusetzt (ich habe bis 20% in Substanz zugesetzt) und filtrirt.

1) Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie. S. 31. Febr. 1893.

Man ist meist gezwungen, sehr oft oder durch Thierkohle zu filtriren, weil der äusserst feine Niederschlag anfangs immer durch's Filter geht. Prüft man das klare Filtrat auf seinen Eiweissgehalt, so ist man unangenehm überrascht starke Xanthoproteinsäurereaction sowie Rothfärbung beim Kochen mit Millon's Reagenz zu bekommen. Auch ruft Zusatz von Salzsäure und Jodquecksilberkalium noch eine Trübung im klaren Filtrat hervor. Dieses Verhalten erklärt zur Genüge, weshalb ich in allen Fällen der oben angeführten Versuche, in welchen ich mich zur Entfernung der gelösten Eiweisssubstanzen der Trichloressigsäure bediente, stickstoffhaltige Präparate erhielt.

Dazu kommt noch der Umstand, dass es ausserordentlich schwer ist, beim Abfiltriren des äusserst feinen, durch Trichloressigsäure bewirkten Niederschlages den Punkt zu bestimmen, wo die Opalescenz des Filtrates nur durch gelöstes Glykogen und nicht mehr durch Eiweisstheilchen, welche durchs Filter gingen, bewirkt wird.

Kommen wir jetzt auf unser Thema zurück, so glaube ich durch meine Versuche gezeigt zu haben, dass alle jene Erscheinungen, aus denen Fränkel die Präexistenz des Glykogens im Organismus negirt und das Vorhandensein einer Glykogeneiweissverbindung deducirt, keineswegs zu dieser Annahme zwingen, sondern soweit sie den thatsächlichen Verhältnissen entsprechen, sehr wohl mit der alten Ansicht vereinbar sind.

Zwar fühle ich mich auf Grund dieser doch immerhin nicht ganz constanten Resultate durchaus nicht berechtigt, die von Fränkel aufgestellte Behauptung, das Glykogen werde erst durch unsere Darstellungsmethoden aus seiner Muttersubstanz abgespalten, ein für allemal zu bestreiten; doch muss ich mit Entschiedenheit betonen, dass kein einziger stichhaltiger Grund geltend gemacht worden ist, der zu dieser Annahme zwingt.

Die Frage hat viel Aehnlichkeit mit der von Krukenberg[1]), Landwehr[2]) und Hammarsten[3]) behandelten über Mucin und

1) Krukenberg, a. a. O.
2) Landwehr, a. a. O.
3) Hammarsten, a. a. O.

Sinistrin, doch hüte man sich wohl, sie für identisch damit zu halten. Dass in Landwehr's Fall das Achrooglykogen dem Mucin durch die Darstellungsweise des letzteren nur mechanisch beigemengt war, wurde schon von Landwehr vermuthet, als er sagte, dass die Mucine wohl keine chemische Individuen, sondern Gemenge von Kohlenhydraten mit stickstoffhaltiger Substanz seien. Hammarsten, der nicht, wie Landwehr, ganze Schnecken, die ja, wie aus Barfurth's Untersuchungen bekannt ist, ausserordentlich reich an Glykogen sein können, zur Darstellung des Mucins benutzte, sondern kritischer verfuhr und nur die mucinbereitenden Theile verarbeitete, erhielt im Mantelmucin nie Achrooglykogen, wohl aber thierisches Gummi, von dem er annimmt, dass es ein Spaltungsproduct des Mucins sei. Ebenso mag auch die von Krukenberg aus Knorpelmucin dargestellte Chondroitsäure, die beim Kochen mit Mineralsäuren Zucker liefert, als solches aufzufassen sein. Allein der Ausspruch Krukenberg's: „das Achrooglykogen und thierische Gummi Landwehr's sind zweifellos ebenso wie seine aus dem sog. Schneckenmucin gewonnenen reinen Kohlenhydrate (sie enthalten stets noch 5% N. Ref.) . . . als hyalogene in den Geweben vorgebildet gewesen und wohl nur zum kleinsten Theil aus diesen als solche direct abgeschieden, zum beiweitem grössten Theil sicherlich erst bei den Manipulationen enstanden", kann soweit er sich auf das Achrooglykogen bezieht, nicht aufrecht erhalten werden, da Hammarsten, wie gesagt, im reinen Mantelmucin kein Glykogen aufzufinden vermochte.

Barfurth[1]) kommt, den Anschauungen Krukenberg's entgegen, in Folge seiner eingehenden Untersuchungen an den Drüsen der Gastropoden zu der Ansicht, dass das Glykogen zwar aus einem dem Mucigen nahestehenden Glykoproteïd abgespalten werde, dass aber diese Abspaltung schon intra vitam durch die specifische Eigenschaft der Drüsenzellen und nicht erst bei der Glykogendarstellung durch die Manipulationen des Physiologen geschehe.

Da aber bis jetzt weder für die Annahme der Präexistenz des Glykogens, noch für eine entgegengesetzte Ansicht ein exacter, bindender

1) a. a. O.

Beweis erbracht ist, so muss es weiteren Forschungen vorbehalten bleiben, diese Frage ihrer Lösung entgegen zu führen.

Zum Schlusse erachte ich es als eine angenehme Pflicht, Herrn Geh.-Rath Prof. Kühne für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für manche mir ertheite Rathschläge meinen verbindlichsten Dank abzustatten. Auch Herrn Dr. Mays fühle ich mich für vielfache im Verlaufe der Untersuchung geleistete Unterstützungen zu Dank verpflichtet.